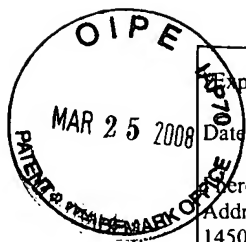


03-26-08

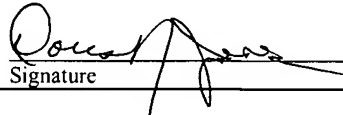
1624

Express Mail" mailing label number EV 393130030 USDate of Deposit March 25, 2008

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Doris N Jones

Printed Name



Signature

PATENT APPLICATION
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Applicant: Moher, Eric David

Group Art Unit: 1624

Serial No.: 10/516,559

Examiner: Jarrell, Noble E.

Application Date: June 6, 2003

Conf No.: 7051

US Nat'l Entry

Date (if applicable): November 30, 2004

For: Prodrugs of Excitatory Amino Acids

Docket No.: X-14978M

COMMUNICATION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

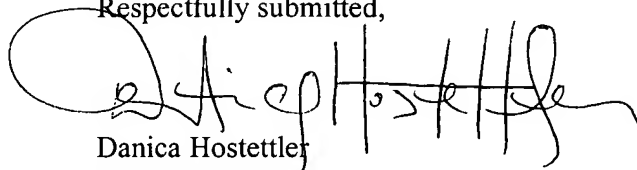
Sir:

Pursuant to the Notice of Allowability, No. 3(c)(1), please find enclosed certified copies of the EP Priority Documents for Application No. 02380120.2 -1211 and Application No. 02380121.0 -1211.

Serial No.: 10/516,559

Please charge any fees or credit any overpayment in connection with this application which may be required by this or any related paper to Deposit Account No. 05-8540.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Danica Hostettler', written over the typed name.

Danica Hostettler
Attorney for Applicants
Registration No. 51,820
Phone: 317-276-3711

Eli Lilly and Company
Patent Division/
P.O. Box 6288
Indianapolis, Indiana 46206-6288

March 21, 2008



FAO: Cheryl A Karres Patent Division
Eli Lilly and Company
PO Box 6288
Indianapolis
Indiana 46206-6288
USA

RECEIVED

MAR 17 2008

ELI LILLY AND COMPANY
Patent Division

Formalities Officer

Name: Joseph, Viviane
Tel.: 2289

or call:
+31 (0)70 340 45 00

Date
07-03-2008

Reference 2002259	X14978M EP	Application No./Patent No. 02380121.0 - 1211
Applicant/Proprietor Eli Lilly & Company		

Übersendung von / Transmission of / Envoi de Antrag vom / Request of / Requête du 09.01.08

- ☒ Prioritätsbeleg / priority document / document de priorité R. 54 EPÜ/EPC/CBE
- ☐ Ausfertigung der Patenturkunde nach Regel 74 EPÜ
Duplicate of the patent Certificate pursuant to Rule 74 EPC
Duplicata du certificat de brevet selon la règle 74 CBE
- ☐ Beglaubigung / Certification
- ☐ Auszug aus dem europäischen Patentregister
Extract from the Register of European Patents
Extrait du Registre européen des brevets
- ☐ Kopien bei Akteneinsicht gemäß Art. 2 (1) des Beschlusses der Präsidentin des EPA vom 12.07.2007 (Sonderausgabe Nr. 3, ABI. EPA 2007, J.2.) und Regel 145 (2) EPÜ
Copies in case of inspection of files pursuant to Art. 2(1) of the decision of the President of the EPO of 12.07.2007 (Special edition No. 3, OJ EPO 2007, J.2.) and Rule 145(2) EPC
Copies en cas d'inspection publique selon l'art. 2(1) de la décision de la Présidente de l'OEB du 12.07.2007 (Edition spéciale no. 3, JO OEB 2007, J.2.) et selon la règle 145(2) CBE
- ☐ Auskunft aus den Akten nach Regel 146 EPÜ
Communication of information contained in the files pursuant to Rule 146 EPC
Communication d'informations contenues dans le dossier selon la règle 146 CBE

1 Anzahl der bestellten Exemplare/number of copies requested/nombre d'exemplaires demandés

Rechnung oder Proforma-Rechnung folgt / Invoice or Proforma invoice to follow / Facture ou facture pro forma va suivre

unter Zugrundelegung von / on the basis of the following / sur la base suivante:

- ☒ Verwaltungsgebühr(en)/Administration fee(s)/Taxe(s) d'administration (Gebührencode/fee code/code des taxes 029)
- ☐ Verwaltungsgebühr(en)/Administration fee(s)/Taxe(s) d'administration (Gebührencode/fee code/code des taxes 025)
- ☐ Beglaubigung/Certification (Gebührencode/fee code/code des taxes 080)
- ☐ Verwaltungsgebühr(en)/Administration fee(s)/Taxe(s) d'administration (Gebührencode/fee code/code des taxes 026)
- ☐ Verwaltungsgebühr(en)/Administration fee(s)/Taxe(s) d'administration (Gebührencode/fee code/code des taxes 027)
- ☐ Verwaltungsgebühr(en)/Administration fee(s)/Taxe(s) d'administration (Gebührencode/fee code/code des taxes 030)
- ☐ Anzahl der Seiten über 100/Number of pages above 100 pages/Nombre de pages supérieur à 100
- ☐ Anzahl der Seiten übermittelt per Telefax in Europa
Number of pages sent via facsimile in Europe
Nombre de pages envoyées par téléfax en Europe
- ☐ Anzahl der Seiten übermittelt per Telefax außerhalb Europas
Number of pages sent via facsimile outside Europe
Nombre de pages envoyées par téléfax hors de l'Europe
- ☒ Abbuchung vom laufenden Konto/debit from deposit account/débit du compte-courant Nr./No./no.
28050027

- ☐ Eingangsstelle/Receiving Section/Section de dépôt
- ☐ Für die Prüfungsabteilung/For the Examining Division/Pour la division d'examen
- ☐ Für die Einspruchsabteilung/ For the Opposition Division /Pour la division d'opposition





**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02380121.0

Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 02380121.0
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 11.06.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Eli Lilly & Company
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C07C/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

02380121.0

PROFÁRMACOS DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES

Esta invención proporciona profármacos de aminoácidos excitadores sintéticos (compuestos de fórmula I) y procedimientos para su preparación. La invención se refiere además a procedimientos de uso y a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de fórmula I para el tratamiento de trastornos neurológicos y trastornos psiquiátricos.

Antecedentes de la Invención

El tratamiento de trastornos neurológicos o psiquiátricos, tales como trastornos de ansiedad, se ha relacionado con la activación selectiva de receptores de aminoácidos excitadores metabotrópicos. Por ejemplo, el ácido (+)-4-amino-2-sulfonilbiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico se describe como un agonista activo del receptor mGluR2 en la Patente de Estados Unidos No. 5.688.826 (la patente '826), expedida el 18 de noviembre de 1997. Además, el ácido (+)-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico se describe como un agonista activo del receptor mGluR2 en la Patente de Estados Unidos No. 5.958.960 (la patente '960), expedida el 28 de septiembre de 1999.

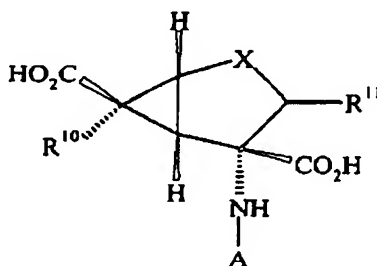
La presente invención proporciona formas de profármaco de compuestos agonistas del receptor mGluR2, que aumentan la potencia in vivo del compuesto parental respectivo y producen una mayor exposición oral del compuesto parental. Además, cuando los compuestos de la presente invención se administran a un paciente, no se detectan niveles circulantes del profármaco, con una alta bioconversión in vitro a la molécula parental. Además, los profármacos peptídicos son estables en todos los intervalos de pH y son no tóxicos. Los compuestos de la presente invención representan el mejor procedimiento para mantener la seguridad y eficacia de los agonistas del receptor mGluR2 descritos previamente con una mayor biodisponibilidad oral. Los

compuestos de la presente invención han mostrado un gran aumento de la potencia oral en el tratamiento de trastornos psiquiátricos sin los problemas asociados de toxicidad, inestabilidad a intervalos de pH deseados y
 5 baja conversión in vivo.

En las Solicitudes PCT con los Nos. de Serie. PCT/US01/45866 y PCT/US02/00488 se describen profármacos de aminoácidos excitadores sintéticos y procedimientos para su preparación.

10 Sumario de la Invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I



(I)

en la que

- 15 A es (Q)_p⁻;
 Q es L-alanilo;
 p es 1;
 X es CR³R⁴;
 R³ es fluoro y R⁴ es hidrógeno;
 20 R¹⁰ es hidrógeno; y
 R¹¹ es hidrógeno;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se apreciará que los compuestos de fórmula I contienen al menos cuatro átomos de carbono
 25 asimétricos; estando tres en el anillo de ciclopropano y estando hasta tres en el anillo de ciclopentano. La presente invención incluye todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de fórmula I,

incluyendo cada uno de los enantiómeros individuales y mezclas de los mismos.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende, en asociación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento para afectar a los receptores metabotrópicos de glutamato asociados a AMPc en un paciente, que comprende administrar a un paciente que requiere la modulación de la neurotransmisión de aminoácidos excitadores una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para afectar a los receptores metabotrópicos de glutamato asociados a AMPc en un paciente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de administración de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II, que comprende administrar a un paciente que requiere la modulación de la neurotransmisión de aminoácidos excitadores una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para administrar una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II.

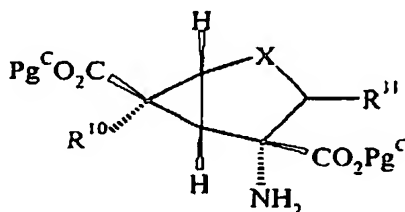
Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno neurológico en un paciente, que comprende administrar al paciente en necesidad de tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un

medicamento para tratar un trastorno neurológico en un paciente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno psiquiátrico en un paciente, que comprende administrar al paciente en necesidad de tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno psiquiátrico en un paciente.

Los compuestos de Fórmula I pueden obtenerse por un procedimiento análogo a uno conocido en la técnica química para la producción de compuestos heterocíclicos estructuralmente análogos o por un procedimiento nuevo descrito en este documento. Tales procedimientos e intermedios útiles para la fabricación de un compuesto de Fórmula I como se ha definido anteriormente se ilustran por los siguientes procedimientos en los que, a menos que se especifique otra cosa, los significados de los radicales genéricos son como se definen en este documento.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar compuestos de Fórmula I, que comprende acilar un compuesto de fórmula (ii)



(ii)

con un amino acilo correspondiente de Fórmula III



en la que p_g^N es un grupo protector de nitrógeno y

A es como se ha definido anteriormente;

después de lo cual, para cualquiera de los procedimientos anteriores, cuando un grupo funcional está protegido usando un grupo protector, se elimina el grupo protector;

después de lo cual, para cualquiera de los procedimientos anteriores, cuando se requiere una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, se hace reaccionar la forma básica de tal compuesto de Fórmula I con un ácido que produzca un contraión farmacéuticamente aceptable; o, para un compuesto de Fórmula I que lleva un resto ácido, se hace reaccionar la forma ácida de tal compuesto de Fórmula I con una base que produzca un catión farmacéuticamente aceptable; o, para un compuesto bipolar de Fórmula I, se neutraliza la forma de sal de adición de ácidos de tal compuesto de Fórmula I; o por cualquier otro procedimiento convencional.

Descripción Detallada de la Invención

Se ha descubierto que los compuestos de la invención son profármacos útiles de compuestos que son agonistas selectivos de receptores metabotrópicos de glutamato y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central tales como enfermedades neurológicas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas, y como agentes antipsicóticos, ansiolíticos, contra el síndrome de abstinencia, antidepresivos, anticonvulsivantes, analgésicos y antieméticos.

Se apreciará que los compuestos de Fórmula I contienen al menos cuatro átomos de carbono asimétricos, estando tres en el anillo de ciclopropano y estando uno en el carbono α del grupo aminoácido. Por consiguiente, los compuestos de la invención pueden existir y aislarse en forma enantioméricamente pura, en

forma racémica o en una mezcla diastereoisomérica.

El resto de aminoácido preferiblemente tiene la configuración del aminoácido natural, es decir, la configuración L con respecto al D-glicerolaldehído.

5 La presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto de Fórmula I. Estas sales pueden existir junto con la porción ácida o básica de la molécula y pueden existir como sales de adición de ácidos, de amonio primario,
10 secundario, terciario o cuaternario, de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos. Generalmente, las sales de adición de ácidos se preparan por la reacción de un ácido con un compuesto de Fórmula I. Las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos
15 generalmente se preparan por la reacción de la forma hidróxido de la sal metálica deseada con un compuesto de Fórmula I. Algunas sales particulares proporcionan ciertas ventajas de formulación debido a su forma cristalina. Las formas no cristalinas de los compuestos
20 pueden ser amorfas e higroscópicas. Las formas cristalinas de los compuestos farmacéuticos algunas veces son más deseables porque no son amorfas.

Los ácidos empleados comúnmente para formar tales sales incluyen ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido
25 clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácidos carboxílicos orgánicos, por ejemplo, ácido glicólico, maleico, hidroximaleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, salicílico, o-acetoxibenzoico u
30 organosulfónico, 2-hidroxietano sulfónico, tolueno p-sulfónico, metanosulfónico o naftaleno-2-sulfónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son la sal clorhidrato y la sal mesilato.

Además de las sales farmacéuticamente aceptables,
35 en la invención se incluyen otras sales. Estas pueden

servir como intermedios en la purificación de compuestos o en la preparación de otras sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, o son útiles para identificación, caracterización o purificación.

Además, la presente invención contempla profármacos de compuestos fluorados como se describe en las Solicitudes Internacionales Nos. PCT/JP99/03984, PCT/JP99/00324 y PCT/JP01/05550. Véanse las Publicaciones Internacionales Nos. WO/0012464, WO/9938839 y WO/0200605, respectivamente. Por ejemplo, la presente invención contempla profármacos del ácido 1S,2R,5S,6S-2-amino-6-fluoro-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico; ácido 1S,2R,4S,5S,6S-2-amino-6-fluoro-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico; ácido 1S,2R,3R,5S,6S-2-amino-3-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico; y ácido 1S,2R,3S,5S,6S-2-amino-6-fluoro-3-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico.

Se ha demostrado que una diversidad de funciones fisiológicas están sometidas a la influencia de una estimulación excesiva o inapropiada de la transmisión de aminoácidos excitadores. Se cree que los compuestos de Fórmula I de la presente invención tienen la capacidad de tratar una diversidad de trastornos neurológicos en mamíferos asociados con este estado, incluyendo trastornos neurológicos agudos tales como déficits cerebrales que se producen después de una cirugía de bypass cardíaco y de injertos, apoplejía, isquemia cerebral, traumatismo de la médula espinal, traumatismo craneal, hipoxia perinatal, paro cardíaco, y lesiones neuronales producidas por hipoglucemias. Se cree que los compuestos de Fórmula I tienen la capacidad de tratar una diversidad de trastornos

neuroológicos crónicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, Corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia inducida por el SIDA, lesiones oculares y retinopatía, trastornos cognitivos, y Parkinson idiopático e inducido por fármacos. La presente invención también proporciona procedimientos para tratar estos trastornos, que comprenden administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de Fórmula I de la presente invención tratan una diversidad de trastornos neurológicos distintos en pacientes, que están asociados con la disfunción del glutamato, incluyendo espasmos musculares, convulsiones, migrañas, incontinencia urinaria, dolor, trastorno disfórico premenstrual (PDD), psicosis (tal como esquizofrenia), tolerancia y síndrome de abstinencia de drogas (tales como nicotina, opiáceos y benzodiacepinas), ansiedad y trastornos relacionados, emesis, edema cerebral, dolor crónico y discinesia tardía. Los compuestos de Fórmula I también son útiles como agentes antidepresivos y analgésicos. Por lo tanto, la presente invención también proporciona procedimientos para tratar estos trastornos, que comprenden administrar a un paciente en necesidad de dichos tratamientos una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las siguientes definiciones pretenden explicar el significado y alcance de las diversas expresiones usadas en este documento. Las expresiones generales usadas en este documento tienen sus significados habituales.

La expresión "que afecta" se refiere a un compuesto de Fórmula II que actúa como agonista en un

receptor de aminoácidos excitadores. La expresión ``receptor de aminoácidos excitadores'' se refiere a un receptor metabotrópico de glutamato, un receptor que está acoplado a efectores celulares a través de proteínas de unión a GTP. La expresión ``receptor metabotrópico de glutamato asociado a AMPc'' se refiere a un receptor metabotrópico que está acoplado a la inhibición de la actividad adenilato ciclasa.

La expresión ``trastorno neurológico'' se refiere a afecciones neurodegenerativas tanto agudas como crónicas, incluyendo déficits cerebrales posteriores a una cirugía de bypass cardíaco y a injertos, isquemia cerebral (por ejemplo, apoplejía debida a un paro cardíaco), traumatismo de la médula espinal, traumatismo craneal, enfermedad de Alzheimer, Corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia inducida por el SIDA, hipoxia perinatal, lesión neuronal producida por hipoglucemias, lesiones oculares y retinopatía, trastornos cognitivos, y Enfermedad de Parkinson idiopática e inducida por fármacos. Esta expresión también incluye otras afecciones neurológicas causadas por la disfunción del glutamato, incluyendo espasmos musculares, migrañas, incontinencia urinaria, tolerancia, adicción y síndrome de abstinencia de drogas (por ejemplo, opiáceos, benzodiacepinas, nicotina, cocaína o etanol), síntomas que se producen cuando se deja de fumar, emesis, edema cerebral, dolor crónico, trastornos del sueño, convulsiones, síndrome de Tourette, trastorno de déficit de atención y discinesia tardía.

La expresión ``trastorno psiquiátrico'' se refiere a afecciones psiquiátricas tanto agudas como crónicas, incluyendo la esquizofrenia, la ansiedad y trastornos relacionados (por ejemplo, ataque de pánico y trastornos cardiovasculares relacionados con el

estrés), la depresión, trastornos bipolares, la psicosis, trastornos obsesivo-compulsivos, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de estrés agudo y trastorno de pánico.

5 Como se usa en este documento, la expresión ``cantidad eficaz'' se refiere a la cantidad o dosis del compuesto, después de la administración de una sola dosis o de dosis múltiples al paciente, que proporciona el efecto deseado en el paciente sometido a diagnóstico o
10 tratamiento.

 Una cantidad eficaz puede determinarse fácilmente por el médico que realiza el diagnóstico, como especialista en la técnica, por medio del uso de técnicas conocidas y por medio de la observación de los
15 resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad o dosis eficaz de un compuesto administrado, el médico que realiza el diagnóstico considera varios factores que incluyen, pero sin limitación: la especie de mamífero; sus dimensiones, su
20 edad y su estado de salud general; la enfermedad específica implicada; el grado o implicación o gravedad de la enfermedad; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de
25 biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosificación seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes. Por ejemplo, una dosis diaria típica puede contener de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 300
30 mg del ingrediente activo. Los compuestos pueden administrarse por una diversidad de vías que incluyen la vía oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, bucal o intranasal. Como alternativa, el compuesto puede administrarse por
35 infusión continua.

Como se usa en este documento, el término ``paciente'' se refiere a un mamífero, tal como un ratón, un cobaya, una rata, un perro o un ser humano. Se entiende que el paciente preferido es un ser humano.

5 El término ``tratamiento'' (o ``tratar''), como se usa en este documento, incluye su significado aceptado generalmente que incluye la prohibición, prevención, represión y ralentización, detención o inversión de la progresión de un síntoma resultante. Como tales, los
10 procedimientos de esta invención incluyen tanto la administración terapéutica como la administración profiláctica.

Las expresiones químicas generales usadas en este documento tienen sus significados habituales. La
15 expresión "grupo protector de nitrógeno", como se usa en este documento y representada por "Pg^N" se refiere a los grupos en los que se desea proteger o bloquear el grupo de nitrógeno frente a reacciones indeseables durante los procedimientos sintéticos. La elección del
20 grupo protector de nitrógeno adecuado usado dependerá de las condiciones que se empleen en las etapas de reacción posteriores en las que se requiere la protección, como es bien conocido por un especialista habitual en la técnica. Los grupos protectores de
25 nitrógeno usados comúnmente se describen en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a Ed. (John Wiley & Sons, New York (1999)). Un grupo protector de nitrógeno preferido es terc-butiloxicarbonilo.

30 La expresión "grupo protector de carboxi", como se usa en este documento y representada por "Pg^C", se refiere a uno de los derivados éster del grupo de ácido carboxílico empleados comúnmente para bloquear o proteger el grupo de ácido carboxílico mientras se
35 realizan reacciones en otros grupos funcionales del

compuesto. Los valores particulares incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, terc-butilo, bencilo, metoximetilo, trimetilsililo y similares. Pueden encontrarse otros ejemplos de tales grupos en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª Ed. (John Wiley & Sons, New York (1999)). Son grupos protectores de carboxi preferidos metilo y etilo. El éster se descompone usando un procedimiento convencional que no afecte a otra parte de la molécula.

La expresión "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un grupo conocido por un especialista en la técnica de la química orgánica, del tipo descrito en el Capítulo 2 de Greene. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, por ejemplo, grupos éter, grupos éter etílico sustituido, grupos éter isopropílico, grupos éter fenílico y fenílico sustituido, grupos éter bencílico y bencílico sustituido, grupos alquilsilil éter, grupos protectores de éster, y similares. Las especies de grupos protectores de hidroxilo empleadas no son críticas siempre que el grupo hidroxilo derivatizado sea estable en las condiciones de la reacción o reacciones posteriores sobre otras porciones de la molécula intermedia y puedan retirarse selectivamente en el momento apropiado sin romper el resto de la molécula, incluyendo cualquier otro grupo protector de hidroxilo.

La expresión "amino acilo" significa un derivado de amino acilo de un aminoácido seleccionado entre el grupo compuesto por los aminoácidos naturales y no naturales como se definen en este documento. Los aminoácidos naturales pueden ser neutros, positivos o negativos dependiendo de los sustituyentes en la cadena lateral. "Aminoácido neutro" significa un aminoácido que contiene sustituyentes de cadena lateral sin carga. Los aminoácidos neutros ilustrativos incluyen alanina,

valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, glutamina y asparagina. "Aminoácido positivo" significa un aminoácido en el que los sustituyentes de la cadena lateral están cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos positivos ilustrativos incluyen lisina, arginina e histidina. "Aminoácido negativo" significa un aminoácido en el que los sustituyentes de la cadena lateral llevan una carga neta negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos negativos ilustrativos incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los aminoácidos preferidos son α -aminoácidos. Los aminoácidos más preferidos son α -aminoácidos que tienen la estereoquímica L en el carbono α . Son α -aminoácidos naturales ilustrativos valina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico.

"Aminoácido no natural" significa un aminoácido para el que no hay ningún codón de ácido nucleico. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, los isómeros D de los α -aminoácidos naturales que se han indicado anteriormente; Aib (ácido aminobutírico); β Aib (ácido 3-aminoisobutírico), Nva (norvalina), β -Ala, Aad (ácido 2-aminoadípico), β Aad (ácido 3-aminoadípico), Abu (ácido 2-aminobutírico), Gaba (ácido γ -aminobutírico), Acp (ácido 6-aminocaproico), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), ácido α -aminopimélico, TMSA (trimetilsilil-Ala), alle (alo-isoleucina), Nle (norleucina), terc-Leu, Cit (citrulina), Orn, Dmp (ácido 2,2'-diaminopimélico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropionico), α - o β -Nal, Cha

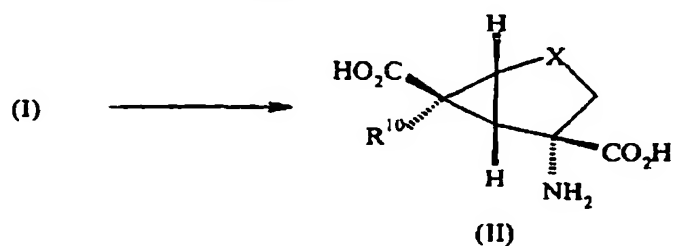
(ciclohexil-Ala), hidroxiprolina, Sar (sarcosina), O-metil tirosina, fenil glicina y similares; aminoácidos cíclicos; aminoácidos N^α-alquilados en los que el aminoácido N^α-alquilado es un N^α-alquil (C1-10) aminoácido tal como MeGly (N^α-metilglicina), EtGly (N^α-etilglicina) y EtAsn (N^α-etilasparagina) y aminoácidos en los que el carbono α lleva dos sustituyentes de cadena lateral. Los α-aminoácidos no naturales ilustrativos incluyen D-alanina, D-leucina y fenilglicina. Los nombres de los aminoácidos naturales y no naturales y los restos de los mismos usados en este documento siguen las convenciones de denominación sugeridas por la IUPAC-IUB Joint Commision on Biochemical Nomenclature (JCBN), como se indica en "Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations, 1983)" European Journal of Biochemistry, 138, 9-37 (1984). Cuando los nombres y las abreviaturas de los aminoácidos y restos de los mismos empleados en esta memoria descriptiva difieran de los indicados, se aclararán los nombres y las abreviaturas que difieren.

Los compuestos de Fórmula I son útiles para el tratamiento de trastornos de mamíferos, y el mamífero preferido es el ser humano.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por una diversidad de procedimientos, de los que algunos se ilustran en los siguientes esquemas. El orden particular de etapas requerido para producir los compuestos de fórmula I depende del compuesto particular que se esté sintetizando, del compuesto de partida y de la labilidad relativa de los radicales sustituidos. En los siguientes esquemas pueden haberse eliminado algunos sustituyentes por claridad, y no se pretende limitar las enseñanzas de los esquemas de forma alguna.

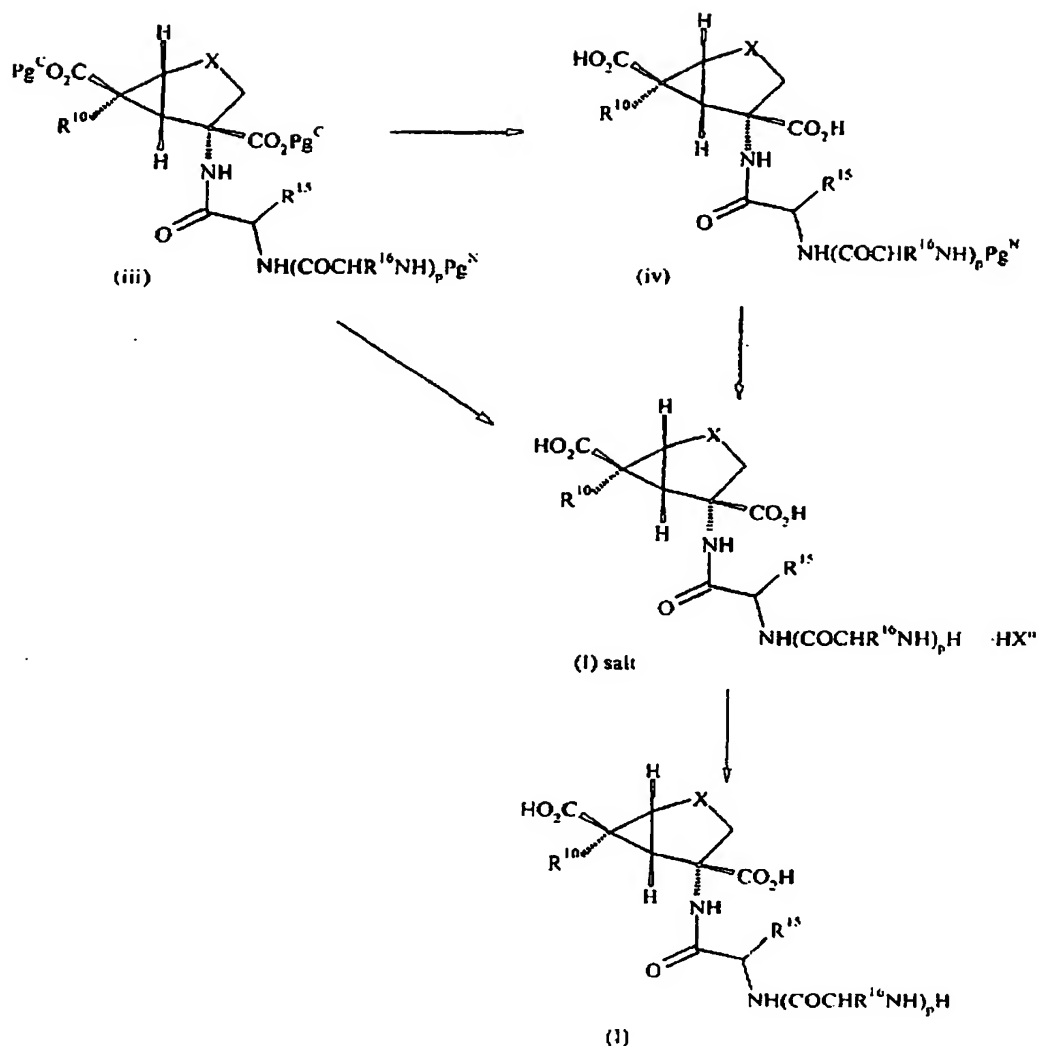
Si no están disponibles en el mercado, los materiales de partida necesarios para los siguientes esquemas pueden obtenerse por procedimientos que se seleccionan entre las técnicas convencionales de química orgánica y de heterociclos, por técnicas análogas a las síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos, y por los procedimientos descritos en las preparaciones y ejemplos, incluyendo los nuevos procedimientos.

Esquema 1



Los compuestos de Fórmula I se convierten por medio de procedimientos enzimáticos o hidrolíticos in vivo para formar compuestos de Fórmula II, como se muestra en el Esquema 1 anterior. En particular, una forma cristalina de un compuesto de Fórmula I puede prepararse de acuerdo con la ruta indicada más adelante en el Esquema 2.

Esquema 2

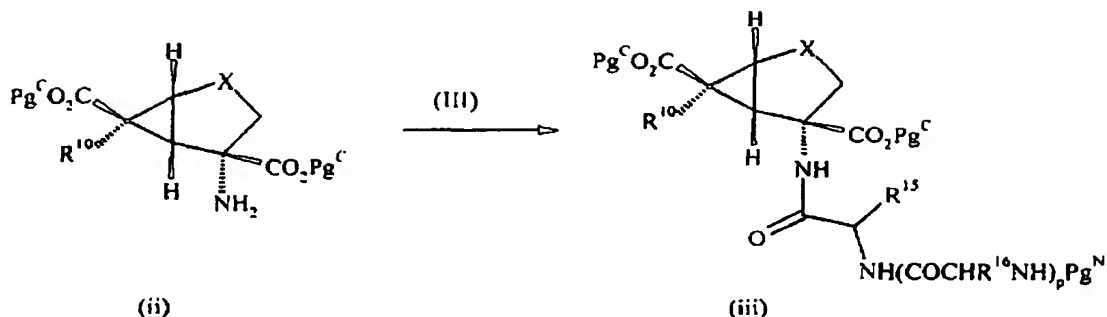


La hidrólisis del compuesto de peptidilo con el grupo diéster protegido de fórmula (iii) con una base adecuada tal como hidróxido de litio o hidróxido sódico en un disolvente adecuado tal como THF, produce el compuesto de peptidilo con el grupo diácido protegido de fórmula (iv). Un compuesto de fórmula (iv) puede desprotegerse con un ácido adecuado en un disolvente adecuado. Tales condiciones pueden producir la correspondiente sal de ácido del compuesto de peptidilo di-ácido, representada en la sal de Fórmula I, como un sólido amorfo o, directamente, un sólido cristalino, en

el que X'' representa el correspondiente anión. En el caso de un sólido amorfo, la posterior cristalización puede producirse en disolventes adecuados. Las sales carboxilato pueden formarse por la introducción de una especie catiónica por un reactivo tal como acetato sódico. Finalmente, el compuesto bipolar puede producirse por tratamiento del compuesto de sal cristalino con una base apropiada.

Por ejemplo, un compuesto de peptidilo con el grupo di-ácido protegido de fórmula (iv), cuando se trata con gas cloruro de hidrógeno en un disolvente adecuado, proporciona la sal clorhidrato desprotegida en forma de un sólido amorfo. El compuesto de clorhidrato amorfo después puede cristalizarse en acetona y agua, produciendo el compuesto de sal clorhidrato cristalino. En el caso de un sólido cristalino que se forma directamente, la filtración de la mezcla de reacción puede producir la sal cristalina. El compuesto bipolar se produce por tratamiento del compuesto de la sal clorhidrato cristalina con hidróxido sódico. Un especialista habitual en la técnica apreciará que un compuesto de Fórmula I puede prepararse por un procedimiento en el que no se aíslan los intermedios indicados.

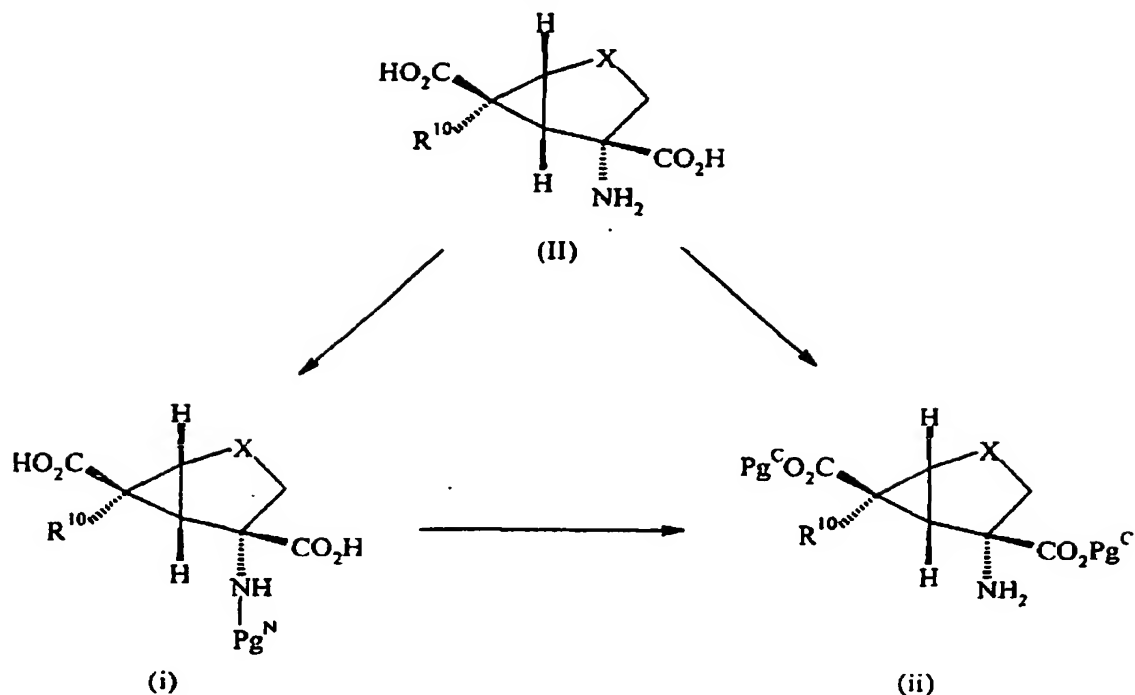
Esquema 3



El di-éster de fórmula (ii) se acila con un compuesto de Fórmula III usando un agente de acoplamiento adecuado para producir un compuesto de peptidilo con el grupo di-éster protegido de fórmula (iii). Como alternativa, esta transformación puede realizarse usando el cloruro de ácido de un compuesto de Fórmula III.

Los reactivos de acoplamiento de péptido adecuados incluyen diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), cloroformiato de isobutilo, clorofosfato de difenilo, 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT), cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino) fosfonio.

Esquema 4



En el Esquema 4 anterior, un compuesto de Fórmula II, un di-ácido, se trata con un agente protector de carboxi adecuado, tal como ácido clorhídrico catalítico o cloruro de tionilo y metanol, produciendo el correspondiente di-éster de fórmula (ii). Como alternativa, un compuesto de Fórmula II primero puede tratarse con un agente protector de nitrógeno, tal como BOC₂O, para producir un compuesto con el nitrógeno protegido de fórmula (i). Después, un compuesto de fórmula (i) puede tratarse con un agente protector de carboxi tal como yoduro de metilo en presencia de una base tal como carbonato potásico, seguido después de un agente desprotector de nitrógeno tal como ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético para producir un compuesto de fórmula (ii).

Los compuestos de Fórmula II son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden encontrarse preparaciones de estos compuestos en la Patente de Estados Unidos No.

5.958.960 (la patente '960).

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente los compuestos de la presente invención y los procedimientos para su síntesis. Los Ejemplos no pretenden ser limitantes del alcance de la invención en ningún aspecto y no deben considerarse de esta forma. Todos los experimentos se realizan con una presión positiva de nitrógeno seco o argón. Todos los disolventes y reactivos se adquieren en fuentes comerciales y se usan según se reciben, a menos que se indique otra cosa. El tetrahidrofurano (THF) seco se obtiene por destilación de sodio o de cetil benzofenona sódica antes del uso. Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H RMN) se obtienen en un Bruker Avance II bay-500 a 500 MHz, en un Bruker Avance I bay-200 a 200 MHz o en un Varian Inova a 500 MHz. La espectroscopía de masas de electronebulización (ESI) se realiza en un instrumento Agilent MSD/B usando acetonitrilo/acetato amónico acuoso como fase móvil. La espectroscopía de masas de bombardeo de átomos libres (FABMS) se realiza en un instrumento VG ZAB-2SE. La espectroscopía de masas de desorción de campo (FDMS) se realiza usando un instrumento VG 70SE o un instrumento Varian MAT 731. Las rotaciones ópticas se miden con un polarímetro Perkin-Elmer 241. La separación cromatográfica en una Waters Prep 500 LC generalmente se realiza usando un gradiente lineal de los disolventes indicados en el texto. La finalización de las reacciones generalmente se comprueba usando cromatografía de capa fina (TLC). La cromatografía de capa fina se realiza usando 60 placas F_{254} de E. Merck Kieselgel, de 5 x 10 cm, y de 0,25 mm de espesor. Las manchas se detectan usando una combinación de detección UV y química (placas sumergidas en una solución de molibdato cérico amónico [75 g de molibdato amónico y 4

g de sulfato cérico (IV) en 500 ml de ácido sulfúrico acuoso al 10%] y después calentadas en una placa caliente). La cromatografía ultrarrápida se realiza como se describe por Still, y col., Still, Kahn y Mitra, *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978). El análisis elemental para el carbono, el hidrógeno y el nitrógeno se determina en un Analizador Elemental 440 de la Corporación de Equipos de Control o se realiza por el Centro Analítico de la Universidad Complutense (Facultad de Farmacia, Madrid, España). Los puntos de fusión se determinan en capilares de vidrio abiertos en un aparato de puntos de fusión de baño de aire caliente Gallenkamp o en un aparato de puntos de fusión Büchi y están sin corregir.

Las abreviaturas, símbolos y términos usados en los ejemplos tienen los siguientes significados.

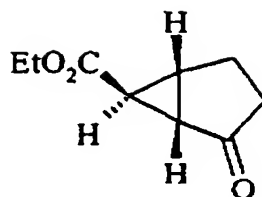
	Ac	=	acetilo				
	Anal.	=	análisis elemental				
	Bn o Bzl	=	bencilo				
20	Bu	=	butilo				
	BOC	=	butiloxicarbonilo				
	Calc.	=	calculado				
	D ₂ O	=	óxido de deuterio				
	DCC	=	diciclohexilcarbodiimida				
25	DDQ	=	diclorodicianoquinona				
	DIBAL-H	=	hidruro de diisobutil aluminio				
	DMAP	=	dimetilaminopiridina				
	DMF	=	dimetilformamida				
	DMSO	=	dimetilsulfóxido				
30	EDC	=	N-etil-N'-dimetilaminopropil carbodiimida				
	ES	=	Electronebulización				
	Et	=	etilo				
	EtOH	=	etanol				
35	FAB	=	Bombardeo de Átomos Rápido				

(Espectroscopía de Masas)

	FDMS =	espectro de masas de desorción de campo
	GC =	cromatografía de gases
	HOAt =	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
5	HOBt =	1-hidroxibenzotriazol
	HPLC =	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
	HRMS =	espectro de masas de alta resolución
	i-PrOH =	isopropanol
	IR =	espectro infrarrojo
10	l =	litro
	Me =	metilo
	MeOH =	metanol
	MPLC =	Cromatografía Líquida de Presión Media
	P.f. =	punto de fusión
15	MTBE =	t-butil metil éter
	NBS =	N-bromosuccinimida
	RMN =	Resonancia Magnética Nuclear
	Ph =	fenilo
	p.o. =	administración oral
20	i-Pr =	isopropilo
	Sal de Rochelle =	tartrato de sodio y potasio
	ta =	temperatura ambiente
	SM =	material de partida
25	TBS =	terc-butildimetilsililo
	TEA =	triethylamina
	Temp. =	temperatura
	TFA =	ácido trifluoroacético
	THF =	tetrahidrofurano
30	TLC =	cromatografía de capa fina
	t-BOC =	terc-butoxicarbonilo.

Preparación 1

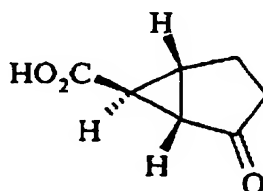
(6S-2-Oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



A una suspensión de bromuro de (etoxicarbonilmetil)dimetil sulfonio (134 g, 585 mmol) en 486 ml de acetonitrilo a temperatura ambiente se le
 5 añaden gota a gota durante 15 minutos 87,4 ml (585 mmol) de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno. Después de agitar durante 1 hora, la mezcla amarilla se trata con 40 g (487 mmol) de 2-ciclopenten-1-ona durante 10 minutos. La mezcla se deja en agitación durante una
 10 noche, momento en el que se añaden 480 ml de terc-butil metil éter, seguido de lavado con ácido clorhídrico 1 N (1 x 240 ml). La capa acuosa se lava con terc-butil metil éter (1 x 240 ml). Los extractos orgánicos se lavan con salmuera (1 x 400 ml), se secan (MgSO_4), se
 15 filtran y se concentran al vacío, proporcionando (6S-2-oxobicyclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo en forma de un sólido naranja (84,8 mg). El material bruto puede purificarse mediante destilación ($\sim 138^\circ\text{C}$, 100 mm de Hg), seguido de la suspensión del destilado
 20 solidificado en heptano, filtrado y secado.

Preparación 2

Ácido (\pm)-2-oxobicyclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico

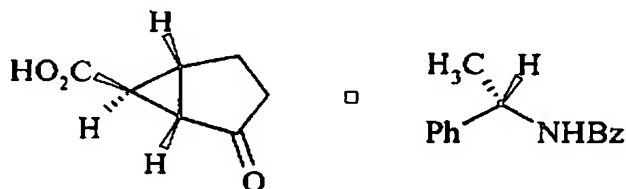


A una solución de (6S)-2-oxobicyclo[3.1.0]hexano-
 25 6-carboxilato de etilo (30,2 g, 180 mmol, sin corregir) en 30 ml de etanol a temperatura ambiente se le añaden

89 ml (178 mmol) de hidróxido sódico 2 N. Después de agitar durante 80 minutos, la mezcla de reacción se lava con terc-butil metil éter (1 x 90 ml) y la capa acuosa se trata con ácido clorhídrico conc. (18 ml) para conseguir un pH = 1,0. La mezcla se trata con 15 g de cloruro sódico seguido de lavado con acetato de etilo (3 x 90 ml). Los extractos orgánicos reunidos se secan (Na_2SO_4), se filtran y se concentran al vacío, dando 23,8 g (95% sin corregir) del compuesto del título en forma de un sólido blanquecino.

Preparación 3

Sal N-bencil- α -metilbencilamina del ácido (+) (6S)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico



A una solución se ácido (\pm)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico (11,9 g, 84,9 mmol, potencia del 100% asumida) en 119 ml de 6:1 de acetato de etilo:etanol a reflujo se le añaden 18 g (85,1 mmol) de (S)-N-bencil- α -metilbencil-amina. Después de la disolución, la mezcla se deja enfriar, seguido de sembrado a 52°C. Después de la refrigeración a temperatura ambiente y la agitación durante 13,5 h más, los cristales se recogen y se lavan con 6:1 de acetato de etilo:etanol (2 x 48 ml). El secado al vacío produce 10,8 g (36%, 77% de) de la sal resuelta en forma de un sólido.

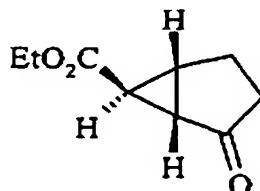
El de de la sal se determina por análisis de GC quiral del éster metílico derivado preparado como se indica a continuación: 150 mg de la sal resuelta se disuelven en 5 ml de cloruro de metileno y se lava con

ácido sulfúrico 1 N (2 x 1 ml). La capa orgánica se
seca, se filtra, se diluye con 2 ml de metanol y se
trata con 1 ml de trimetilsilil diazometano 2 M en
hexanos. Después de agitar a temperatura ambiente
5 durante 15 minutos, la mezcla se concentra al vacío,
produciendo el éster metílico adecuado para el análisis
de GC quiral.

Condiciones de GC: columna 30 m X 0,25 mm X 0,25 μ
 β -DEX 325, temperatura de la estufa 140°C, helio como
10 gas portador a 1 ml/min, detección FID a 250°C,
división de 1 μ l 1:100, muestra a una concentración de
1 mg/ml en cloruro de metileno.

Preparación 4

(6*S*)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



15

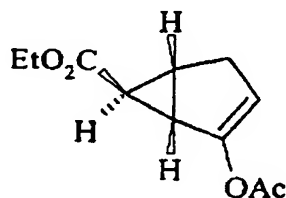
A una suspensión de 46,3 g (132 mmol) de Sal N-
bencil- α -metilbencilamina del ácido (+) (6*S*)-2-
oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico en 200 ml de
acetato de etilo se le añaden 198 ml (198 mmol) de
20 hidróxido sódico 2 N. Después de mezclar bien, las
capas se separan y la capa acuosa se lava con acetato
de etilo (1 x 200 ml). La capa acuosa se trata con 18
ml (211 mmol) de ácido clorhídrico conc. y 100 g de
cloruro sódico. La mezcla se deja agitar durante 30
25 minutos seguido de lavado con acetato de etilo (2 x 200
ml). Los extractos orgánicos se secan (MgSO_4), se
filtran y se concentran al vacío, proporcionando 18,3 g
(99%) del ácido resuelto [ácido (+) (6*S*)-2-

oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico] en forma de un sólido blanco.

Después, se disuelven 10 g (71 mmol) del producto de ácido resuelto bruto anterior en 42 ml de etanol y se trata gota a gota con 4 ml (71 mmol) de ácido sulfúrico conc. La mezcla se calienta a 45°C y se deja en agitación durante 75 minutos. Después de la refrigeración a temperatura ambiente, se añaden 42 g de agua junto con 20 ml de acetato de etilo y 12 g de bicarbonato sódico. Después de agitar durante varios minutos, la mezcla se lava con acetato de etilo (2 x 50 ml). Los extractos orgánicos reunidos se secan (MgSO₄), se filtran y se concentran al vacío, proporcionando 11 g (92%) de (6*S*)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo en forma de un sólido blanco. La cristalización en 6:1 de heptano:terc-butil metil éter (3,5 ml por g de sustrato) proporciona este compuesto del título con un rendimiento de aproximadamente el 80% y un ee >98% según se determina por análisis de GC quiral.

Preparación 5

Acetato de (6*S*)-6-(etoxicarbonil)biciclo[3.1.0]hex-2-en-2-ilo



Una mezcla de (6*S*)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo (380,1 g, 2,26 mol) y ácido sulfúrico (18 M, 6,3 ml, 0,11 mol) en acetato de isopropenilo (2,26 l) se calienta a reflujo usando un aparato Dean-Stark durante 2,5 horas, momento en el que el análisis GC revela una mezcla 9:1 del compuesto del

título frente a (6S)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo. Después de la retirada de 950 ml de disolvente por destilación durante 1 hora, la GC muestra que la relación de producto/material de partida es de 17:1. Se añaden más acetato de isopropenilo (900 ml) y H₂SO₄ conc. (3,15 ml) y la mezcla se agita a reflujo durante otras 15 horas, momento en el que la GC muestra una relación 27:1 de producto/material de partida. Después de retirar por destilación 1,35 l más de disolvente, la mezcla se enfría a temperatura ambiente antes de diluirse con MTBE (2 l), H₂O (250 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (600 ml). Las capas se separan, la capa orgánica se lava con salmuera (400 ml) y las capas orgánicas reunidas se secan (Na₂SO₄), se filtran y se concentran hasta un aceite rojo oscuro/pardo (540 g). El aceite bruto se divide en dos porciones iguales y se filtra a través de SiO₂ ultrarrápido (713 g para cada lote), eluyendo con 10:1 de heptano:acetato de etilo. Las fracciones que contienen el producto de los dos lechos cortos se combinan y se concentran, produciendo el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (460 g, 97%; 90% corregido para el disolvente por RMN). La cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexanos (1:5) proporciona una muestra analíticamente pura del compuesto del título en forma de un aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +185^\circ$ (c 1,48, CHCl₃)

500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 5,19-5,18 (m, 1H), 4,12 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 4,11 (q, 1 H, J = 7,0 Hz), 2,74-2,69 (m, 1H), 2,48-2,43 (m, 2H), 2,22-2,19 (m, 1 H), 2,16 (s, 3H), 1,39 (dd, 1H, J = 2,5, 2,5 Hz), 1,25 (t, 3H, J = 7,0 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (CDCl₃) δ 173,37,

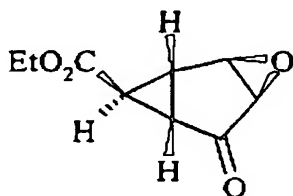
169,01, 152,26, 111,56, 61,28, 32,47, 32,40, 29,72, 24,97, 21,67, 14,95.

FTIR (CHCl_3) 3026 (m), 2985 (m), 1724 (s), 1272 (s), 1187 (s) cm^{-1} .

5 ES HRMS calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 228,1236, encontrado 228,1252.

Preparación 6

(3*S*,1*R*,6*R*)-7-Oxa-oxotriciclo[4.1.0.0<2,4>]heptano-3-carboxilato de etilo



10

Una mezcla de acetato de (6*S*)-6-(etoxicarbonil)biciclo[3.1.0]hex-2-en-2-ilo (212,2 g, 1,01 mol) y 2,3-dicloro-5,6.-diciano-1,4-benzoquinona (252,0 g, 1,11 mol) en 2,02 l de 1,4-dioxano se calienta a reflujo y se agita durante 17 horas, momento en el que el análisis de GC muestra la conversión completa de (6*S*)-4-oxobiciclo[3.1.0]hex-2-eno-6-carboxilato de etilo. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se diluye con THF (564 ml). Después, la mezcla se enfría a 8°C y se le añade 1,8-azabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (377 ml, 2,52 mmol) durante 30 minutos, de tal forma que la temperatura de la solución se mantiene por debajo de 10°C. Después, la mezcla se enfría a 5°C y se añade durante 50 minutos hidróperóxido de *terc*-butilo (70% en peso en agua, 210 ml, 1,51 mol), manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 9°C. Después, la mezcla se agita durante otros 50 minutos, la reacción se filtra y la torta parda se lava con MTBE (2 x 800 ml). Al filtrado se le añaden 1,20 l de HCl 1 N y, después de mezclar

15

20

25

30

bien, las capas se separan. La capa orgánica se lava secuencialmente con NaHCO_3 acuoso saturado (1,20 l), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ acuoso saturado (1,20 l) y salmuera (600 ml). Después, la solución se seca (Na_2SO_4) y se concentra hasta un sedimento naranja que se diluye con 200 ml de heptano. Los volátiles se evaporan para producir un sólido naranja que se tritura con 350 ml de heptano y se filtra, lavando la torta con más heptano (2 x 175 ml). El sólido recogido se seca al vacío a temperatura ambiente durante 17 horas, proporcionando 138,7 g (75%) del compuesto del título en forma de un sólido pardo-amarillo. La cristalización en MTBE proporciona una muestra analíticamente pura del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

$[\alpha]^{25}_D +2,3^\circ$ (c 1,20, CHCl_3), $+8,4^\circ$ (c 1,28, acetona): p.f. 129-130°C.

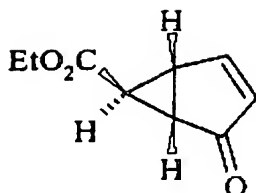
500 MHz ^1H RMN (CDCl_3) δ 4,16 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz), 3,99 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz), 3,24-3,23 (m, 1H), 2,96-2,94 (m, 1H), 2,21- 2,19, (m, 1H), 2,08 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz), 1,26 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); 125 MHz ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 201,19, 168,84, 62,42, 57,04, 51,25, 31,16, 30,54, 29,60, 14,79.

FTIR (KBr) 3087 (w), 3059 (w), 3051 (w), 3007 (w), 2993 (w), 2963 (w), 1753 (s), 1719 (s), 1273 (s), 1191 (s), 1009 (m), 848 (m) cm^{-1} .

Análisis calculado para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$: C, 59,34; H, 5,53. Encontrado: C, 59,32; H, 5,43.

Preparación 7

(6S)-4-oxobiciclo[3.1.0]hex-2-eno-6-carboxilato de etilo



Aunque el compuesto del título se usa típicamente *in situ* en la preparación de (3*S*,1*R*,6*R*)-7-oxa-5-oxotriciclo[4.1.0.0<2,4>]heptano-3-carboxilato de etilo, se obtiene una muestra del compuesto del título analíticamente pura filtrando la mezcla de reacción que contiene este compuesto y evaporando el filtrado para dar un sólido pardo. El sólido se resuspende en acetato de etilo, la suspensión se filtra y el filtrado se concentra. La cromatografía del residuo sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (1:5 a 1:2) da el compuesto del título, que se recrystaliza en acetato de etilo caliente y se cromatografía de nuevo usando las condiciones previas, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco.

$[\alpha]^{25}_D$ -268° (c 1,17, CHCl₃).

p.f. 97-98°C.

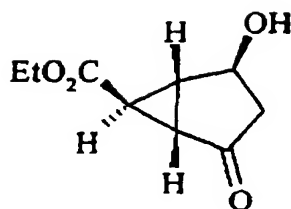
500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,60 (ddd, 1H, J = 5,5, 2,5, 0,75 Hz), 5,73 (dd, 1H, J = 5,0, 0,5 Hz), 4,15 (q, 2H, J = 7,0 Hz), 2,96-2,94 (m, 1H), 2,63-2,61 (m, 1H), 2,60 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 1,26 (t, 3H, J = 7,0 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (CDCl₃) δ 203,96, 168,61, 160,33, 130,29, 62,03, 46,53, 30,72, 29,62, 14,82.

FTIR (KBr) 3080 (m), 2996 (m), 1717 (s), 1695 (s), 1266 (s), 1291 (m), 1191 (s), 1179 (s) cm⁻¹.

Análisis calculado para C₉H₁₀O₃: C, 65,05; H, 6,07. Encontrado: C, 64,97; H, 6,01.

Preparación 8

(4*S*,6*S*)-4-hidroxi-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



Una solución agitada de (3*S*,1*R*,6*R*)-7-oxa-5-oxotriciclo[4.1.0.0<2,4>]heptano-3-carboxilato de etilo (36,3 g, 0,20 mol) en 667 ml de acetona se trata
 5 secuencialmente con acetato sódico (36,1 g, 0,44 mol), yoduro sódico (65,8 g, 0,44 mol) y ácido acético (27,5 ml, 0,48 mol). La mezcla se deja en agitación a 30°C durante 15 horas antes de retirarse la acetona al vacío, dejando detrás un sólido pardo que se reparte
 10 entre acetato de etilo (323 ml) y H₂O (323 ml). Las capas se separan y la capa acuosa se lava con acetato de etilo (3 x 323 ml). Los extractos orgánicos reunidos se lavan secuencialmente con Na₂S₂O₃ acuoso saturado (364 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (364 ml). Cada lavado
 15 acuoso se extrae de nuevo con acetato de etilo (323 ml). Los extractos orgánicos se secan (Na₂SO₄), se filtran y se concentran hasta un aceite rojo-pardo que se disuelve en 300 ml de etanol. La evaporación de los volátiles produce el producto del título en forma de un
 20 aceite rojo-pardo (41,8 g, 114%). La cromatografía en columna sobre gel de sílice usando acetato de etilo/hexanos (1:2 a 2:1) seguido de cristalización en MTBE caliente proporciona una muestra analíticamente pura del compuesto del título en forma de un sólido
 25 blanco.

$[\alpha]^{25}_D +3,9^\circ$ (c 1,39, CHCl₃), +6,0 (c 1,69, MeOH)

p.f. 81-82°C.

500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 4,60 (s a, 1H), 4,16 (q, 2H, J= 7,0 Hz), 2,66 (dd, 1H, J= 5,0, 4,0 Hz), 2,42-
 30 2,40 (m, 1H), 2,34 (dd, 1H, J = 19,0, 5,5 Hz), 2,24 (d

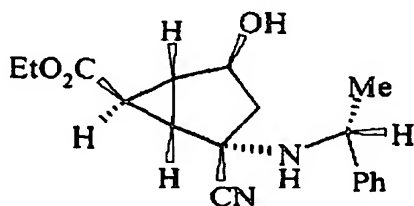
a, 1H, $J = 3,0$ Hz), 2,07 (d, 1H, $J = 19,0$ Hz), 1,91 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz), 1,27 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 209,74, 170,07, 69,04, 62,32, 43,47, 36,89, 34,95, 26,14, 14,83.

5 FTIR (KBr) 3607 (w), 3447 (w), 3025 (m), 2985 (w), 1739 (s), 1728 (s), 1270 (s), 1187 (s) cm^{-1} .

Análisis calculado para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 58,69; H, 6,57. Encontrado: C, 58,48; H, 6,63.

Preparación 9

10 2-[[((1R)-1-feniletíl)amino] (2S,4S,6R)-2-ciano-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



A una solución de (4S,6S)-4-hidroxi-2-oxobiciclo[3.1.0]-6-carboxilato de etilo (68,2 g
15 corregido a 60,0 g debido a la contaminación de etanol, 0,326 mol) en etanol (332 ml) y H_2O (332 ml) se le añade (R)-metilbencilamina (46,3 ml, 0,359 mmol) y NaCN (20,8 g, 0,424 mol), manteniendo la temperatura entre 20 y 25°C . Después se añade HCl concentrado (35,3 ml,
20 0,424 mol) durante 10 minutos mientras se mantiene la temperatura de reacción anterior. La mezcla parda oscura se agita durante 1 hora antes de sembrarse con el compuesto del título para iniciar la cristalización. La suspensión se en agitación durante 1 hora antes de
25 añadir H_2O (664 ml). Después, la suspensión se agita durante 1,75 horas más y el compuesto del título se recoge en forma de un sólido castaño que se lava con H_2O (332 ml). Se saca aire a través de la torta húmeda del filtro durante 25 minutos antes de que el material
30 se use directamente en la hidrólisis de nitrilo (peso

de la torta húmeda 145 g). Aunque el compuesto del título se descompone rápidamente durante el secado al vacío a temperaturas mayores de 25°C, es posible secar pequeñas muestras al vacío a temperatura ambiente sin descomposición.

$[\alpha]^{25}_D +81,6^\circ$ (c 1,18, CHCl₃).

p.f. 70-72°C (descomp.)

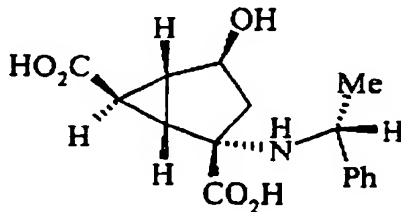
500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,39 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,26-7,16 (m, 3H), 4,31 (d, 1H, J = 5,0 Hz), 4,22 (q, 1H, J = 6,5 Hz), 3,93-3,85 (m, 2H), 2,33 (d, 1H, J = 15,0 Hz), 2,01 (t a, 1H, J = 4,5 Hz), 1,64 (dd, 1H, J = 15,0, 5,0 Hz), 1,55-1,54 (m, 1H), 1,40-1,39 (m, 4H), 1,17 (t, 3H, J = 7,0 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (CDCl₃) δ 170,54, 144,85, 128,61, 127,45, 127,38, 121,88, 72,17, 61,02, 60,66, 56,57, 45,82, 36,70, 34,45, 25,83, 21,75, 14,22.

FTIR (KBr) 3568 (m), 3489 (m), 3285 (m), 2923 (m), 2228 (w), 1712 (s), 1298 (m), 1197 (m) cm⁻¹.

FAB HRMS calculado para C₁₈H₂₃N₂O₃ [M+H]⁺ 315,1709, encontrado 315,1704.

Preparación 10

Ácido 2-(((1*R*)-1-feniletil)amino) (2*S*,4*S*,6*R*)-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



25 A una solución de la torta húmeda de 2-(((1*R*)-1-feniletil)amino) (2*S*,4*S*,6*R*)-2-ciano-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo (teórico 0,326 mmol) en DMSO (220 ml) se le añade lentamente H₂O₂ al 30% (44,5 ml, 0,426 mmol),

manteniendo la temperatura por debajo de 27°C. La temperatura se redujo a 19°C y se añadió lenta y cuidadosamente NaOH 5 N (52,3 ml, 0,262 mol) al principio durante 15 minutos, manteniendo la temperatura entre 22 y 27°C. Para manipular la exotermia de esta reacción se requiere un baño de hielo de capacidad apropiada. Después, la mezcla parda heterogénea se agita durante 20 minutos al intervalo de temperatura anterior y la HPLC muestra que el material de partida se ha consumido, dando un intermedio de amida. Después, la reacción se agita durante 1,5 horas más, se añade Na₂SO₃ (13,7 g, 0,109 mol) y la mezcla se agita durante 15 minutos, momento en el que la mezcla da un resultado negativo en el ensayo de peróxidos con papel de almidón-yoduro. Después de la adición de NaOH 3 N (291 ml, 0,873 mol), la mezcla se calienta a 85°C y se agita durante 18 horas. La mezcla parda homogénea se enfría a 30°C y se añade HCl concentrado para reducir el pH a 3,6, mientras se mantiene la temperatura entre 30 y 35°C. Después de que haya comenzado la cristalización a pH 3,6, la suspensión se agita durante 15 minutos antes de reducir el pH a 2,5. Después, la mezcla se agita durante 10 minutos más, se enfría a 2°C y se agita durante 2 horas antes de recoger el sólido gris y lavarlo con H₂O fría (400 ml) y EtOH (300 ml). Los sólidos recogidos se secan al vacío a 45°C durante 17 horas, proporcionando 42,9 g (43% desde el inicio de la Preparación 18) del compuesto del título. Para procesar todo el compuesto del título producido en la reacción, se recupera de las aguas madre de la siguiente forma. La porción de etanol de las aguas madre se evapora y el residuo se combina con la porción acuosa de las aguas madre. Después de la destilación de H₂O (485 ml) a presión reducida, el pH de las aguas madre se ajusta a 12,9 con 70 ml de NaOH 5 N y 5 ml de

NaOH al 50%. Después, la solución se lava con *n*-BuOH (3 x 800 ml), su pH se ajusta a 2,5 con HCl concentrado y la solución se concentra. El residuo se diluye con EtOH (100 ml) y los volátiles se evaporan (2 X). El residuo se diluye con EtOH (150 ml) y el sólido castaño que contiene compuesto del título adicional y sales se lava con EtOH (75 ml) y se seca a 50°C al vacío hasta un peso de 102 g. Las dos extracciones del compuesto del título se usan en la posterior esterificación.

[α]_D²⁵, +4,5° (c 1,17, NaOH 1 N).

p.f. 220°C (gris a partir de blanquecino), 280°C (pardo)

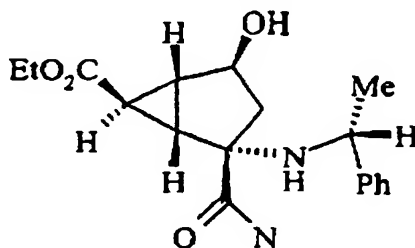
500 MHz ¹H RMN (D₂O, KOD) δ 7,39 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,19-7,04 (m, 5H), 3,92 (d, 1H, J = 5,0 Hz), 3,67 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 1,76 (d, 1H, J = 15,0 Hz), 1,54-1,52 (m, 1H), 1,37 (dd, 1H, J = 15,0, 5,0 Hz), 1,15 (d, 3H, J = 6,5 Hz), 1,12 (dd, 1H, J = 6,0, 3,0 Hz), 0,92 (t, 1H, J = 3,3 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (D₂O, KOD) δ 185,82, 182,96, 148,01, 131,31, 129,97, 129,78, 74,99, 73,84, 58,78, 46,91, 38,05, 35,02, 27,34, 27,15.

FTIR (KBr) 3366 (m), 3072 (s), 2886 (s), 1696 (m), 1611 (m), 1560 (m), 1455 (m), 1377 (m), 1278 (m), 1202 (m), 1188 (m) cm⁻¹.

Análisis calculado para C₁₆H₁₉NO₅: C, 62,94; H, 6,27; N, 4,59. Encontrado: C, 62,70; H, 6,21; N, 4,67.

Preparación 11

2-(((1*R*)-1-feniletíl)amino) (2*S*,4*S*,6*R*)-2-carbamoil-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



Aunque el compuesto del título se usa típicamente *in situ* en la preparación del ácido 2-(((1R)-1-feniletil)amino)(2*S*,4*S*,6*R*)-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico, el
 5 compuesto podría aislarse, aunque con alguna pérdida de rendimiento debida a la hidrólisis de éster asociada durante la hidrólisis de nitrilo. En el aislamiento, la mezcla de reacción de hidrólisis de nitrilo se reparte entre CH₂Cl₂ y H₂O tan pronto como se consume el 2-
 10 (((1R)-1-feniletil)amino)(2*S*,4*S*,6*R*)-2-ciano-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo. Después de secarse la capa orgánica (MgSO₄) y de concentrarse, el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice usando EtOAc/hexanos (2.1)
 15 a EtOAc, produciendo el compuesto del título en forma de una espuma blanca.

$[\alpha]^{25}_D +61,3^\circ$ (c 1,20, CHCl₃).

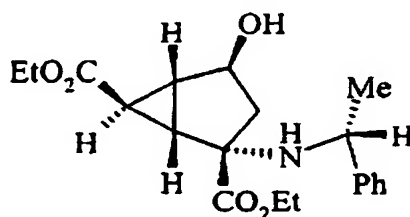
500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,32-7,20 (m, 5H), 7,19 (s
 a, 1H, J= 4,0 Hz), 5,49 (d a, 1H, J = 4,0 Hz), 4,88
 20 (d, 1H, J= 11,5 Hz), 4,24 (dd, 1H, J= 11,5, 6,0 Hz),
 4,06-4,00 (m, 2H), 3,77 (q, 1H, J= 7,0 Hz), 2,21 (d,
 1H, J= 15,0 Hz), 2,18-2,15 (m, 2H), 1,71 (s a, 1H),
 1,54 (dd, 1H, J = 14,5, 6,0 Hz), 1,38 (d, 3H, J = 6,5
 Hz), 1,32 (t, 1H, J = 3,3 Hz), 1,24 (t, 3H, J = 7,0
 25 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (CDCl₃) δ 180,42, 171,47, 146,05,
 128,97, 127,43, 126,48, 73,16, 70,76, 61,08, 56,00,
 42,82, 35,97, 35,67, 26,13, 21,53, 14,34.

FTIR (CHCl₃) 3441 (m), 3345 (m), 2975 (w), 1725
 (s), 1665 (s), 1288, 1186 (m) cm⁻¹.

30 Análisis calculado para C₁₈H₂₄N₂O₄: C, 65,04; H,
 7,28; N, 8,43. Encontrado: C, 65,41; H, 7,58; N, 8,32.

Preparación 12

2-[[((1R)-1-feniletil) amino] (2S,4S,6R)-2-(
(etoxicarbonil)-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-6-
carboxilato de etilo



5

A una suspensión de ácido 2-[[((1R)-1-feniletil) amino] (2S,4S,6R)-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (4 g, 13 mmol) en 48 ml de etanol a temperatura ambiente se le
10 añade cloruro de acetilo (11,2 ml, 157 mmol) mediante un embudo de adición, de tal forma que se mantiene un reflujo suave. La mezcla resultante se deja en agitación durante 16 horas más a reflujo y, después de enfriar a temperatura ambiente, se concentra al vacío
15 hasta un residuo sólido. El sólido se trata lentamente con una solución de bicarbonato sódico (6,6 g) en 100 ml de agua seguido de lavado con acetato de etilo (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos reunidos se secan (MgSO₄), se filtran y se concentran al vacío, dando 4,7
20 g (99%) del compuesto del título en forma de un sólido. La cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5), seguida de cristalización en Et₂O proporciona una muestra analíticamente pura del compuesto del título en forma
25 de un sólido blanco.

$[\alpha]^{25}_D +52,5^\circ$ (c 1,30, CHCl₃).

p.f. 73-74°C.

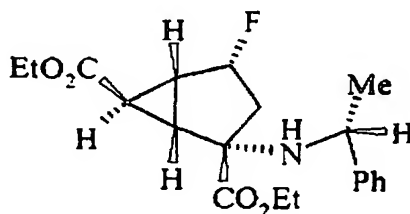
500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,29-7,14 (m, 5H), 4,25 (dq, 1H, 11,0, 7,0 Hz), 4,18 (dd, 1H, J = 9,5, 5,5 Hz),

4,10 (dq, 1H, $J = 11,0, 7,0$ Hz), 3,92 (dq, 1H, $J = 11,0, 7,0$ Hz), 3,82 (dq, 1H, $J = 11,0$ Hz, $7,0$ Hz), 3,67 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz), 2,73 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz), 2,15-2,12 (m, 2H), 2,01-1,99 (m, 1H), 1,89 (dd, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 1,61 (dd, 1H, $J = 15,0, 6,0$ Hz), 1,36 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz), 1,33-1,30 (m, 6H), 1,18 (t, 3H, $J = 7,0$);
 125 MHz ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 178,11, 171,59, 146,32, 128,41, 127,07, 126,85, 73,33, 70,15, 62,07, 60,75, 56,66, 44,72, 36,78, 33,61, 26,24, 20,07, 14,37, 14,23.
 FTIR (KBr) 3492 (s), 3303 (m), 3055 (w), 2981 (w), 2896 (w), 1722 (s), 1705 (s), 1289 (m), 1251 (m), 1177 (m) cm^{-1} .

Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_5$: C, 66,46; H, 7,52; N, 3,88. Encontrado: C, 66,42; H, 7,44; N, 3,92.

Preparación 13

2-(((1R)-1-feniletil)amino) (2S,4R,6R)-2-etoxycarbonil)-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo



A una solución de 2-(((1R)-1-feniletil)amino) (2S,4S,6R)-2-(etoxycarbonil)-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo (59,0 bruto, 0,163 mol) en CH_2Cl_2 (690 ml) a -20°C se le añade Deoxo-Fluor® (45,1 ml, 0,245 mol) durante 15 minutos, manteniendo la temperatura entre -15 y -20°C . La mezcla se agita durante 20 minutos a esta temperatura y a 0°C durante 15 minutos antes de la adición lenta de Na_2CO_3 acuoso al 15% (650 ml) mientras se mantiene la temperatura por debajo de 10°C . Las capas se separan y la capa acuosa se extrae de nuevo

con CH_2Cl_2 (150 ml). Las capas orgánicas reunidas se secan (Na_2SO_4) y se concentran hasta un aceite pardo (73 g). El aceite se purifica sobre una capa de gel de sílice (400 g) eluyendo con EtOAc/heptano (1:6), produciendo el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (49,7 g, 84%).

$[\alpha]^{25}_D +36,2^\circ$ (c 1,30, CHCl_3).

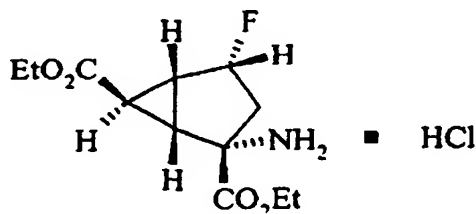
500 MHz ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,29-7,14 (m, 5H), 5,22 (ddt, 1H, $J = 8,0, 4,5$ Hz, $J_{\text{HF}} = 56,0$ Hz), 4,16 (dq, 1H, $J = 11,0, 7,0$ Hz), 4,05 (dq, 1H, 11,0, 7,0 Hz), 3,96 (dq, 1H, 10,5, 7,0 Hz), 3,85 (dq, 10,5, 7,0 Hz), 3,66 (q, 1H, 6,5 Hz), 2,45 (dd, 1H, $J = 14,0, 8,0$ Hz), 2,16-2,12 (m, 1H), 1,95 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz), 1,81 (dt, 1H, $J = 3,5$, $J_{\text{HF}} = 3,5$ Hz), 1,51 (ddd, 1H, $J = 14,0, 8,0$ Hz, $J_{\text{HF}} = 22,0$ Hz), 1,32 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz), 1,27 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz), 1,21 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); 125 MHz ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175,29, 171,66, 146,21, 128,45, 127,03, 126,90, 92,65 (d, $J_{\text{CF}} = 182$ Hz), 68,68 (d, $J_{\text{CF}} = 4,9$ Hz), 61,70, 60,92, 56,13, 38,60 (d, $J_{\text{CF}} = 23,0$ Hz), 33,07 (d, $J_{\text{CF}} = 7,6$ Hz), 32,23 (d, $J_{\text{CF}} = 22,0$ Hz), 26,26 (20,22 (d, $J_{\text{CF}} = 3,9$ Hz), 14,41, 14,24.

FTIR (KBr) 3028 (w), 2983 (w), 1724 (s), 1705 (s), 1293 (m), 1242 (m), 1190 (m), 1037 (m), 1013 (m) cm^{-1} .

Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{FNO}_4$: C, 66,10; H, 7,21; N, 3,85. Encontrado: C, 66,02; H, 7,00; N, 3,95.

Preparación 14

Clorhidrato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Una mezcla de 2-(((1R)-1-feniletil)amino) (2S,4S,6R)-2-(etoxicarbonil)-4-

fluorobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo (68,4 g, 0,188 mol), HCl conc. (15,7 ml, 0,188 mol) y Pd al 10%/C (seco, 13,7 g) en EtOH (400 ml) se pone en una atmósfera de hidrógeno (344,737 kPa) durante 18 horas. El catalizador se retira por filtración y el filtrado se evapora, dando el compuesto del título en forma de una espuma blanquecina (59,2 g, 206% corregido a 97% debido a la contaminación con EtOH). La cristalización en EtOAc/MTBE produjo una muestra analíticamente pura del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

$[\alpha]^{25}_D +55,6^\circ$ (c 1,17, CHCl₃).

p.f. 86-88°C.

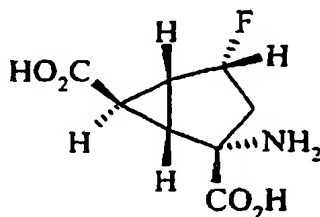
500 MHz ¹H RMN (CDCl₃) δ 9,20 (s a, 2H), 5,50 (ddt, 1H, J = 8,0, 4,5 Hz, J_{HF} = 56,0 Hz), 4,31 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 4,20-4,07 (m, 3H), 2,88 (t, 1H, J = 3,0 Hz), 2,71 (dd, 1H, J = 14,5, 8,0 Hz), 2,48-2,43 (m, 2H), 2,16 (ddd, 1H, J = 14,5, 7,5 Hz, J_{HF} = 22,0 Hz), 1,34 (t, 3H, J = 7,0 Hz), 1,25 (t, 3H, J = 7,0 Hz); 125 MHz ¹³C NMR (CDCl₃) δ 171,12, 169,41, 91,94 (d, J_{CF} = 189 Hz), 63,85, 63,66 (d, J_{CF} = 3,8 Hz), 61,73, 34,55 (d, J_{CF} = 26,4 Hz), 31,58 (d, J_{CF} = 7,8 Hz), 30,80 (d, J_{CF} = 24,1 Hz), 20,22, 14,3°1, 14,21.

FTIR (KBr) 3353 (m), 3173 (w), 1729 (s), 1547 (m), 1294 (m), 1269 (m), 1195 (m), 1011 (m) cm⁻¹.

Análisis calculado para C₁₂H₁₈FNO₄: C, 48,74; H, 6,48; N, 4,74. Encontrado: C, 48,80; H, 6,41; N, 4,76.

Preparación 15

Ácido 1S,2R,4S,5S,6S-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Una solución de NaOH 3 N (251 ml, 0,753 mol) se añade lentamente a clorhidrato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (59,2 g bruto, 0,188 mol teórico), manteniendo la temperatura por debajo de 26°C. Después, la mezcla se agita durante 10 minutos y es homogénea. La mezcla se agita durante 1,25 horas a temperatura ambiente antes de reducir el pH lentamente a pH 2 usando HCl conc. mientras se mantiene la temperatura entre 20 y 26°C. A pH 2,8 la mezcla comienza a cristalizar y la suspensión se agita a este pH durante 10 minutos antes de reducir el pH a 2,1 con HCl conc. Después de 15 minutos más de agitación, se añade *i*-PrOH (67 ml) y la suspensión se enfría a 0°C y se agita durante 2 horas. El sólido se recoge y se lava con 37 ml de H₂O fría/*i*-PrOH (4:1). El sólido recogido se seca al vacío a 40°C durante 18 horas, produciendo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (33,1 g, 87% desde el inicio de la Preparación 23).

Preparación 16

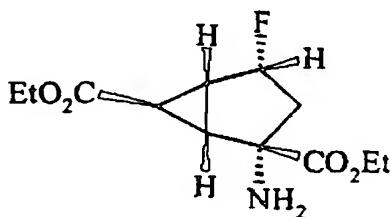
Resuspensión del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico

Una suspensión agitada de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (33,0 g, 0,162 mmol) en H₂O (165 ml) se calienta a 89°C durante 1 hora y se le añade *i*-PrOH (41 ml). Después, la mezcla se agita durante 5 minutos a reflujo (83°C) antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente y de

agitar durante 4 horas. El producto se recoge, se lava con *i*-PrOH/H₂O (1:4, 40 ml) e *i*-PrOH (25 ml), y se seca al vacío a 40°C durante 18 horas, produciendo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (30,6 g, 93%).

Preparación 17

Éster etílico del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



A una suspensión de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (14,45 g, 71,12 mmol) en 202 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente se le añade gota a gota durante 20 minutos cloruro de tionilo (26 ml, 356 mmol). La suspensión se calienta a reflujo y se deja en agitación durante 3 horas seguido de refrigeración a temperatura ambiente durante una noche. La solución resultante se concentra al vacío hasta un residuo que se diluye con 136 ml de acetato de etilo y se trata con 306 ml de carbonato sódico acuoso al 10% durante 15 minutos con agitación manual, de forma que el pH final es 10. Las capas se separan y la capa acuosa se lava con acetato de etilo (1 x 136 ml). Los extractos orgánicos reunidos se lavan con salmuera (1 x 136 ml), se secan (MgSO₄), se filtran y se concentran al vacío, proporcionando 17,07 g (93%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

FDMS: $M^+ + 1 = 260$.

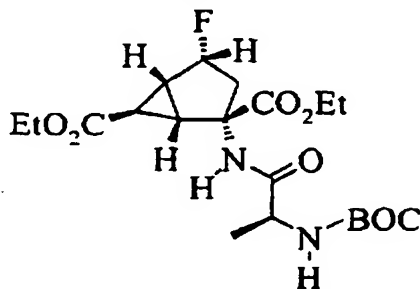
Análisis calculado para $C_{11}H_{18}FNO_4 \cdot 0,1 H_2O$: C, 55,21; H, 7,03; N, 5,37. Encontrado: C, 55,10; H, 6,96; N, 5,22.

p.f. 64-66°C.

5 $[\alpha]^{25}_D = +20^\circ$ (c = 0,96, MeOH), $[\alpha]^{25}_D = +15^\circ$ (c = 1,21, DMSO).

Preparación 18

10 Éster etílico del ácido 1S,2R,4S,5S,6S-2-[2'S-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



A una solución de N-Boc-L-alanina (38,62 g, 204 mmol) en 396 ml de cloruro de metileno a -22°C en una atmósfera de nitrógeno se le añade gota a gota durante
15 minutos N-metil morfolina (22,44 ml, 204 mmol) seguido de cloroformiato de iso-butilo (26,48 ml, 204 mmol) de forma que la temperatura de la reacción no exceda de -18°C. La suspensión fina resultante se deja en agitación a -20°C durante 30 minutos, momento en el
20 que se añade durante 40 minutos una solución de éster etílico del ácido 1S,2R,2S,5S,6S-2-amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (49,46 g, 191 mmol) en 247 ml de cloruro de metileno, de tal forma que la temperatura de reacción no exceda de -
25 16°C. Después de completarse la adición, la reacción se retira del baño de refrigeración y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 70 minutos, momento en el que la temperatura de reacción se alcanza 15°C y el

color se transforma en naranja pálido. La reacción se trata con 408 ml de ácido clorhídrico 1 N seguido de agitación durante 5 minutos y separación de las capas. La capa orgánica se lava con bicarbonato sódico acuoso saturado (1 x 408 ml), se seca (Na_2SO_4), se filtra y se concentra al vacío, produciendo una espuma blanca (88,16 g).

FDMS: $M^+ + 1 = 260$.

Análisis calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{FNO}_4 \cdot 0,1\text{H}_2\text{O}$: C, 55,21; H, 7,03; N, 5,37. Encontrado: C, 55,10; H, 6,96; N, 5,22.

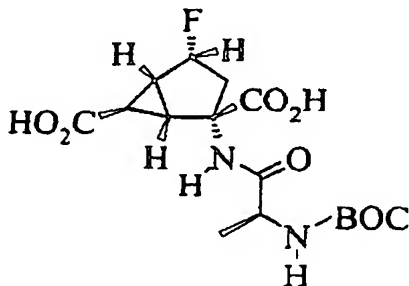
p.f. = 64-66°C.

$[\alpha]^{25}_D = +20^\circ$ ($c = 0,96$, MeOH), $[\alpha]^{25}_D = +15^\circ$ ($c = 1,21$, DMSO).

15

Preparación 19

Ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



20

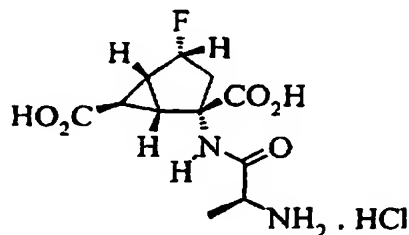
A una solución de éster etílico del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (88,16 g, 191 mmol) en 238 ml de tetrahidrofurano a temperatura ambiente se le añaden 238 ml (477 mmol) de hidróxido sódico 2 N. La mezcla bifásica se deja en agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2,5 horas, momento en el que la reacción es homogénea. La mezcla se diluye con 238 ml de *t*-butil metil éster seguido de

25

mezclado y separación de capas. La capa acuosa se diluye adicionalmente con 238 ml de agua y se filtra para eliminar la materia particulada. La solución se trata con HCl concentrado (42,9 ml, 515 mmol) durante 5 30 minutos seguido de sembrado con el compuesto del título y de agitación durante 1 hora. La suspensión resultante se filtra, se lava con agua (2 x 100 ml) y se seca al vacío a 45°C durante 40 horas, proporcionando 72,2 g del compuesto del título en forma de un sólido blanco. Una porción del sólido (69,5 g) se 10 deja en agitación con 490 ml de acetona durante 1 hora, produciendo una solución turbia que se filtra y se lava con acetona (2 x 100 ml). El filtrado se concentra al vacío hasta obtener una espuma blanca que se seca 15 adicionalmente al vacío a 45°C durante 16 horas, proporcionando 61,8 g (corregido para 12% p/p de acetona) del compuesto del título.

Ejemplo 1

Clorhidrato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-
20 aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-
dicarboxílico



Una suspensión de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-
(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-
25 fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (49,6 g
corregido, 132 mmol) en 447 ml de acetona se deja en
agitación a 50°C durante 35 minutos. La solución turbia
se filtra para clarificar la solución, seguido de
agitación con 100 ml de acetona. El filtrado
30 blanquecino transparente se trata gota a gota durante 5

minutos con 22,1 ml (265 mmol) de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se calienta a 45-50°C (se observa desprendimiento de gas) y se deja en agitación durante 90 minutos, después de lo cual la mezcla se
 5 siembra con el compuesto del título, después se retira la fuente de calor y se deja enfriar gradualmente a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la temperatura había alcanzado 25°C y se añade acetona (942 ml) a la suspensión durante 90 minutos. La suspensión
 10 se deja en agitación durante 16 horas más seguido de filtración, lavado con acetona (2 x 200 ml) y secado al vacío a 45°C durante 9 horas y a temperatura ambiente durante 64 horas más, produciendo 40,2 g (97%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco. Una
 15 muestra de este material se recrystaliza como se indica a continuación: Se disuelven 1,06 g en 0,5 ml de agua y 2,12 ml de acetona con calentamiento a 50°C seguido de dilución con 5,3 ml más de acetona y sembrado. La mezcla ligeramente turbia se trata con 4,2 ml más de
 20 acetona seguido de nuevo de sembrado y retirada de la fuente de calor y se deja que se enfríe gradualmente a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión resultante se diluye adicionalmente con 9,5 ml más de acetona durante 30 minutos seguido de agitación durante
 25 15 h. Después del filtrado, el lavado con acetona (2 x 5 ml) y el secado al vacío a 45°C durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 60 h, se obtienen 0,905 g (recuperación del 85%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

30 P.f. (DSC) 183°C.

$[\alpha]_D^{25} +33^\circ$ (c 1,06, CH₃OH)

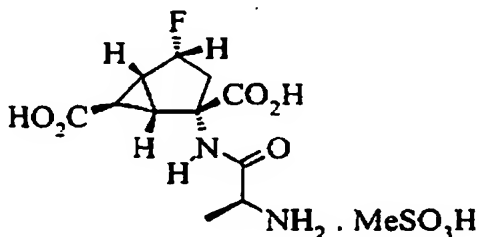
500 MHz ¹H RMN (CD₃OD) δ 5,58-5,42 (m, 1H), 3,92 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 2,96 (dd, 1H, J = 14, 8,0 Hz), 2,41-2,39 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 2,10 (t, 1H, J = 3,0 Hz), 1,52 (d, 3H, J = 7,5 Hz), 1,51-1,42 (m, 1H);

35

125 MHz ^{13}C RMN (CD_3OD) δ 173,74, 173,62, 170,00, 93,48 y 92,04 (división C-F), 63,95 y 63,92 (división C-F), 48,80, 36,89 y 36,70 (división C-F), 32,97 y 32,91 (división C-F), 30,05 y 29,87 (división C-F), 19,37, 16,28; FTIR (DRIFT) 3430 (w), 3016 (s), 1721 (s), 1662 (s), 1496 (s), 1190 (m), 1024 (m), 637 (w) cm^{-1} .

Ejemplo 2

Mesilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-sulfonilbiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Una suspensión del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (1,87 g corregido, 4,98 mmol) en 16,8 ml de acetona se deja en agitación a 50°C durante 15 minutos. La solución turbia se filtra para clarificar la solución seguido de aclarado con acetona (3 x 1,25 ml). El filtrado transparente se diluye con 0,935 ml de agua, se pone en un baño de calentamiento a 50°C y se trata gota a gota con 0,647 ml (9,97 mmol) de ácido metanosulfónico (se observada desprendimiento de gas). Después de 25 minutos se produce una suspensión blanca. Después de agitar durante un total de 2 horas, se añaden 35,5 ml más de acetona durante 5-10 minutos. El calor se retira y la suspensión se deja enfriar gradualmente a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de filtración, lavado con acetona (2 x 8 ml) y secado al vacío a 45°C durante 14 horas, dando 1,77 g (95%) del compuesto del título en forma de un sólido rosa pálido.

Una muestra de este material se recrystaliza como se indica a continuación: Se disuelven 1,65 g en 1,16 ml de agua y 4,95 ml de acetona con calentamiento a 50°C, seguido de dilución con 1,65 ml más de acetona y
 5 sembrado. Se retira la fuente de calor y la mezcla se deja enfriar gradualmente a temperatura ambiente. Se añade simultáneamente acetona (26,4 ml) durante 40 minutos. La suspensión resultante se deja en agitación durante 3 horas más. Después de filtrar, se lava con
 10 acetona (2 x 6 ml) y se seca al vacío a 45°C durante 6 h y a temperatura ambiente durante 60 horas, obteniéndose 1,59 g (recuperación del 96%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco:

p.f. (DSC) 206°C.

15 $[\alpha]^{25}_D +30^\circ$ (c 1,05, CH₃OH).

500 MHz ¹H RMN (CD₃OD) δ 5,58-5,42 (m, 1H), 3,92 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 2,96 (dd, 1H, J = 14, 8,0 Hz), 2,70 (s, 3H), 2,41-2,39 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 2,10 (t, 1H, J = 3,0 Hz), 1,52 (d, 3H, J = 7,5 Hz),
 20 1,51-1,42 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 2,10 (t, 1H, J = 3,0 Hz), 1,52 (d, 3H, J = 7,5 Hz), 1,51-1,42 (m, 1H), ;
 125 MHz ¹³C RMN (CD₃OD) δ 173,73, 173,61, 170,02, 93,50 y 92,05 (división C-F), 63,91, 48,79, 38,30 y 36,70 (división C-F), 32,97 y 32,91 (división C-F), 30,02 y
 25 29,84 (división C-F), 19,37, 16,26.

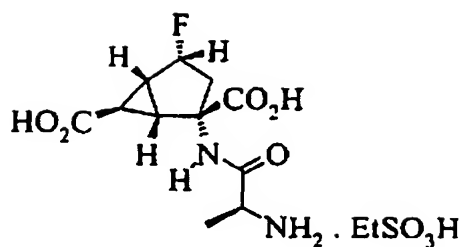
FTIR (DRIFT) 3472 (w), 1717 (s), 1691 (s), 1557 (m), 1220 (s), 1019 (m), 781 (m), 563 (m) cm⁻¹.

Análisis calculado para C₁₂H₁₉DN₂O₈S: C, 38,92; H, 5,17; N, 7,56. Encontrado: C, 38,96; H, 4,97; N, 7,51.

30

Ejemplo 3

Esilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



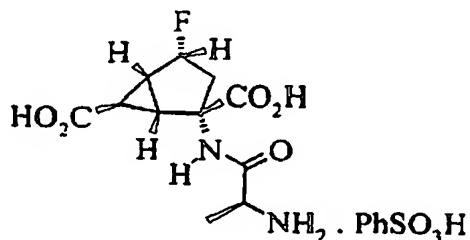
Una suspensión de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (0,2 g, 0,534 mmol) en 8 ml de acetona se deja en agitación a 50°C durante 5 minutos. La solución turbia se filtra para clarificar la solución seguido de aclarado con acetona (1 x 0,4 ml). El filtrado transparente se diluye con 0,1 ml de agua, se pone en un baño de calentamiento a 50°C y se trata gota a gota con 0,124 ml (1,07 mmol) de ácido etanosulfónico (se observa desprendimiento de gas). Después de 90 minutos se produce una suspensión blanca. Se retira la fuente de calor y la suspensión se deja enfriar gradualmente a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de agitación durante 2 horas más. La filtración, el lavado con acetona (2 x 1 ml) y el secado al vacío a 45°C durante 4 horas y a temperatura ambiente durante 60 horas producen 0,173 g (84%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

p.f. (DSC) 210°C (descomp.).

500 MHz ¹H RMN (CD₃OD) δ 5,58-5,42 (m, 1H), 3,92 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 2,96 (dd, 1H, J = 14, 8,0 Hz), 2,80 (q, 2H, 7,3 Hz), 2,42-2,37 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 2,09 (t, 1H, J = 3,0 Hz), 1,52 (d, 3H, J = 7,5 Hz), 1,51-1,40 (m, 1H), 1,30 (t, 3H, J = 7,5 Hz).

Ejemplo 4

Besilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



5 Una suspensión de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-
(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-
fluorobiciclo[3.1.0]-2,6-dicarboxílico (0,402 g, 1,07
mmol) en 3,6 ml de acetona se deja en agitación a 50°C
durante 10 minutos. La solución turbia se trata con una
10 cucharilla de celite y se filtra para clarificar la
solución seguido de aclarado con acetona (2 x 0,4 ml).
La solución transparente se pone en un baño de
calentamiento a 50°C y se trata con 226 mg (90%, 1,29
mmol) de ácido bencenosulfónico como una solución en
15 0,113 ml de agua seguido de un aclarado con 0,4 ml de
acetona (se observa desprendimiento de gas). Después de
agitar a reflujo suave durante 4 horas, se retira la
fuente de calor y la reacción se trata con 8 ml de
acetona durante 10 minutos seguido de sembrado. Después
20 de 1 hora, se forma una solución que se diluye con 3,2
ml de acetona seguido de agitación a temperatura
ambiente durante 15,5 horas. La filtración, el lavado
con acetona (2 x 10 ml) y el secado al vacío a 45°C
durante 24 h proporciona 313 mg (62% corregido para
25 acetona al 10% en peso) del compuesto del título en
forma de un sólido blanco.

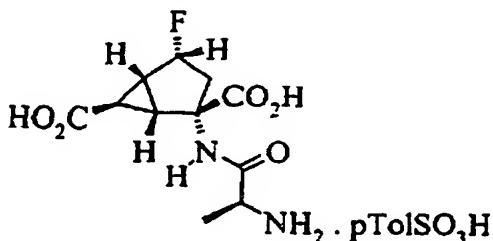
p.f. (DSC) 132°C.

500 MHz ¹H RMN (CD₃OD) 7,86-7,80 (m, 2H), 7,46-7,37
(m, 3H), 5,58-5,42 (m, 1H), 3,92 (q, 1H, J= 7,0 Hz),
30 2,96 (dd, 1H, J = 14, 8,0 Hz), 2,42-2,37 (m, 1H), 2,35-

2,30 (m, 2H), 2,09 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz), 1,52 (d, 3H, $J = 7,5$ Hz), 1,51-1,40 (m, 1H).

Ejemplo 5

Tosilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Una suspensión de ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-[2'*S*-2'-(terc-butoxicarbonilamino)propionil]amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (1,04 g corregido, 2,78 mmol) en 9,36 ml de acetona se deja en agitación a 50°C durante 15 minutos. La solución turbia se trata con una cucharilla de celite y se filtra para clarificar la solución, seguido de aclarado con acetona (1 x 2,08 ml y después 1 x 1,04 ml). El filtrado transparente se pone en un baño de calentamiento a 50°C y se trata con 634 mg (3,33 mmol) de ácido p-toluenosulfónico monohidrato como una solución en 0,317 ml de agua, seguido de un aclarado con 0,317 ml de acetona (se observa desprendimiento de gas). Después de agitar a reflujo suave durante 4 horas, la reacción se retira del baño de calentamiento y se trata con 10,4 ml de acetona durante 10 minutos. La solución incolora transparente se siembra y se observa la formación de un precipitado durante 30 minutos, después de lo cual se introducen 10,4 ml más de acetona durante 20 minutos. La suspensión se deja en agitación durante 4 horas más seguido de filtración, lavado con acetona (2 x 10 ml) y secado al vacío a 45°C durante 14 horas, proporcionando

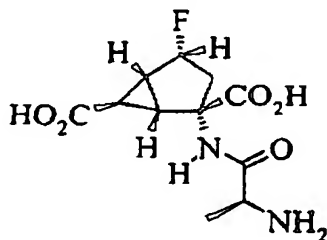
995 mg (75% corregido para 3% en peso de acetona) del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

p.f. (DSC) 155°C

500 MHz ^1H RMN (CD_3OD) δ 7,70 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz),
 5 7,34 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 5,58-5,42 (m, 1H), 3,92 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz), 2,96 (dd, 1H, $J = 14, 8,0$ Hz), 2,42-2,30 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,09 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz), 1,52 (d, 3H, $J = 7,5$ Hz), 1,51-1,40 (m, 1H).

Ejemplo 6

10 Ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico

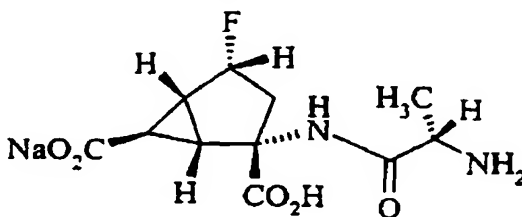


A una solución de mesilato del ácido
 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-
 15 fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (0,5 g, 1,35 mmol) en 1 ml de agua a 50°C se le añaden 5 ml de etanol 3 A seguido, después de unos cuantos minutos, de 0,27 ml (1,35 ml) de hidróxido sódico acuoso 5 N. Se
 20 retira la fuente de calor y la solución incolora transparente se diluye con 2,5 ml de etanol, se siembra y se diluye con adicionalmente con 7,5 ml de etanol durante 30 minutos. La suspensión resultante se deja en
 25 agitación, enfriando posteriormente a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente a temperatura ambiente durante 2 horas. El sólido se enfría y se lava con etanol (1 x 10 ml) seguido de secado al vacío a 45 °C durante 18,5 horas, produciendo 0,301 g (rendimiento del 78% corregido para 1,6% en peso de metanosulfonato
 30 sódico y 3% en peso de etanol), del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

500 MHz ^1H RMN (D_2O) δ 5,45-5,30 (m, 1H), 3,88 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz), 2,58 (dd, 1H, $J = 14, 8,0$ Hz), 2,33-2,30 (m, 1H), 2,27-2,26 (m, 1H), 1,92 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz), 1,36 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,41-1,32 (m, 1H); 125
 5 MHz ^{13}C RMN (D_2O) δ 177,46, 176,92, 170,42, 94,56 y 93,19 (división C-F), 65,36, 49,01, 36,75 y 36,57 (división C-F), 33,61 y 35,55 (división C-F), 30,54 y 30,36 (división C-F), 20,27, 16,67.

Ejemplo 7

10 Sal monosódica del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



A una solución de mesilato del ácido
 15 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-2-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-4-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6.-dicarboxílico (70 mg, 0,19 mmol) en 420 μl de metanol a 60°C se le añade una solución caliente de acetato sódico (46,5 mg, 0,57 mmol) en 470 μl de metanol con un aclarado de 230 μl de metanol.
 20 La solución se vuelve turbia después de un par de minutos. Se retira la fuente calor. La solución turbia resultante se diluye con 280 μl de metanol seguido de sembrado para favorecer la cristalización. La suspensión resultante se enfría lentamente a
 25 temperatura ambiente durante 1 hora y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto se aísla por filtración, se lava con metanol (2 x 280 μl) y se seca al vacío a 45°C durante 15 horas, produciendo 52,5 mg (rendimiento del 91% corregido para 2,3% en peso de

metanosulfonato sódico y 0,2% en peso de metanol) del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

500 MHz ^1H RMN (D_2O) δ 5,44-5,29 (m, 1H), 3,89 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz), 2,65 (s, 3H), 2,56 (dd, 1H, $J = 14,8,0$ Hz), 2,16-2,13 (m, 1H), 2,10-2,09 (m, 1H), 1,74 (t, 1H, $J = 3,1$ Hz), 1,38 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,36-1,28 (m, 1H); 125 MHz ^{13}C RMN (D_2O) δ 180,00, 178,72, 170,13, 95,40 y 93,99 (división C-F), 64,97, 49,06, 37,25 y 37,07 (división C-F), 33,01 y 32,94 (división C-F), 29,64 y 29,46 (división C-F), 22,48, 16,68.

Los compuestos profármacos de la presente invención pueden evaluarse frente al compuesto parental correspondiente por medio de diversos ensayos de absorción celular. Estos ensayos pueden proporcionar datos comparativos para permitir que un especialista habitual en la técnica identifique compuestos que ya se han absorbido en la célula para proporcionar una exposición superior. Dos de tales ensayos incluyen el Ensayo de Absorción de Gly-Sar y el Ensayo Caco-2, descritos más adelante.

Ensayo de Absorción de Gly-Sar

Se ha descubierto que algunos fármacos peptidomiméticos administrados por vía oral se absorben a través del sistema del transporte de péptidos intestinal. Yang y col., Pharm. Res. 16(9) (1999). En particular, se ha estudiado el transportador de péptidos intestinal hPepT1 para evaluar su expresión de inhibición de la absorción de peptidilo y su nivel correspondiente de reconocimiento dentro de una célula. Meredith y col., Eur. J. Biochem. 267, 3723-3728 (2000). Además, se ha pretendido caracterizar el mecanismo de absorción intestinal de aminoácidos en el transportador hPepT1 como estrategia eficaz para identificar absorciones de fármacos orales mejoradas.

Han, y col., Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem) 40(1): 259-260 (1999); Sawada, y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291(2): 705-709 (1999).

La Patente de Estados Unidos No. 5.849.525 describe procedimientos que podrían usarse para medir el nivel de afinidad de compuestos de la presente invención con el transportador hPepT1.

Por ejemplo, podrían usarse Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) transfectadas de forma estable que sobreexpresan el transportador hPepT1 para ensayar los compuestos de la presente invención. Las células CHO se controlarían con respecto a la absorción de Gly-Sar, de manera que cuando se absorbe en presencia de los compuestos profármacos de la presente invención en cantidades mayores que cuando la célula carece de los compuestos profármacos de la presente invención, es indicativo de una actividad agonista; y cuando la absorción de los compuestos profármacos de la presente invención es menor que la absorción en ausencia de los compuestos profármacos de la presente invención, es indicativo de una actividad inhibidora.

Ensayo Caco-2

Un procedimiento particular para medir la absorción de compuestos de la presente invención en las células es estudiar el vehículo de transporte de péptidos de la línea de células de intestino humano Caco-2. Se someten a varios pases células de adenocarcinoma humano (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, NY, y/o ATCC, Rockville, MD) en medio Eagle Modificado de Dulbecco que contiene un 10% de suero de ternero fetal y un 1% de solución de aminoácidos no esenciales en medio esencial mínimo sin la adición de piruvato sódico ni antibióticos. Estas células carecían de micoplasma y se usaron con un número de pases entre 28 y 40. Para medir el flujo, se

cultivan entre 5 y 10 x 10⁴ células en placas de múltiples pocillos recubiertas con colágeno durante 13-18 días y el medio se reemplaza cada dos o tres días.

La absorción del fármaco se mide a 37°C usando un compuesto de ensayo empleando una técnica de bandeja de agrupamiento (véase Gazzola y col., Anal. Biochem. 115, 386-74 (1981)). El tampón de flujo es solución salina equilibrada de Earle sin bicarbonato de contiene Mes 25 mM valorado a pH 6,0 con KOH, y cloruro de colina en lugar de cloruro sódico. La osmolalidad del tampón de flujo se ajusta a 300 ± 5 mosmol/kg con cloruro de colina. Como marcador se usa [³H]Inulina para el fluido extracelular, que se adhiere a las células durante el procedimiento del lavado para estimar el tiempo 0 para determinar la velocidad de absorción. Se preparan diariamente soluciones recientes de los compuestos de ensayo y dipéptidos. Al final del experimento, las células se lisan en agua y los compuestos pueden detectarse en los lisados celulares usando LC/MS/MS. Las proteínas se miden por el procedimiento descrito en Smith y col., Anal. Biochem. 150, 76-85 (1985).

La absorción se mide durante 40 minutos. Los porcentajes de absorción inicial se calculan en la región lineal de la regresión a lo largo del tiempo y el tiempo cero se estima como se ha descrito anteriormente usando regresión lineal. El porcentaje de inhibición se calcula basándose en la velocidad de absorción de control medida en ausencia de un dipéptido. Como ejemplos de este ensayo Caco-2, véase Dantzig & Bergin, Biochim, Biophys. Acta 1027, 211-17 (1990).

Exposición In Vivo Medida por Concentración en Plasma de Rata

Para estudiar la exposición in vivo de compuestos de Fórmula II después de la dosificación oral de

compuestos de Fórmula I en comparación con compuestos de Fórmula II, se realizan estudios que miden las concentraciones en plasma del compuesto respectivo de Fórmula II en ratas. Se obtienen 344 ratas Fischer macho maduras (190-270 g) de Harlan Sprague-Dawley, Cumberland, IN USA, y se aclimatan en el alojamiento de estudio durante 3 días. En el día 4, los compuestos de ensayo se disuelven en agua tamponada (1 mg/ml = compuesto de ensayo/fosfato diácido potásico 20 mM, pH=2) y se administran por vía oral como una sola dosis de 5 mg/kg. Se recogen muestras de sangre a través del seno orbital o punción cardíaca (último punto de tiempo) después de 0,5 y 1 hora o, como alternativa, después de 1 y 3 horas. Las muestras de plasma se almacenan a -20°C en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, un inhibidor de proteasa, antes del análisis. Las muestras de plasma y los compuestos de patrón interno se pretratan por extracción en fase sólida (soporte SAX, metanol/agua/ácido acético diluido).

Como se muestra en la Tabla 1, las concentraciones en plasma (ng/ml) del compuesto respectivo de Fórmula II para cada compuesto de ensayo se determinan por LC/MS/MS y se presentan como una suma de las concentraciones a los puntos de tiempo de 0,5 y 1 hora o, como alternativa, de 1 y 3 horas.

<p style="text-align: center;"><u>Tabla 1</u> Ensayo de Exposición In Vivo</p>	
Compuesto	Exposición en Rata (ng/ml de ácido 1S,2R,4S,5S, 6S-2-amino-4- fluorobiciclo[3.1.0]hexano- 2,6-dicarboxílico)
Ejemplo 1	5271 ng/ml (después de 5 mg/kg p.o.)
Forma no profármaco del Ejemplo 1	1162 ng/ml (después de 5 mg/kg p.o.) 1342 ng/ml (después de 10 mg/kg p.o.)

Como se ha mostrado anteriormente en las Tabla 1, cuando se administran por vía a oral a ratas, los compuestos de la presente invención presentan un aumento significativo de la concentración en plasma del compuesto parental en comparación con el propio compuesto parental. Esto demuestra que los compuestos de la presente invención se convierten en los compuestos parentales, compuestos de Fórmula II, in vivo.

Los compuestos de la presente invención preferiblemente se formulan antes de la administración. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse por procedimientos bien conocidos por un especialista habitual en la técnica. Para fabricar las composiciones de la presente invención, el ingrediente activo normalmente se

mezclará con un vehículo, se diluirá por un vehículo o se encerrará dentro de un vehículo, y puede estar en forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pomadas que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso de compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

Algunos ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe acuoso, metil celulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones además pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar la liberación rápida, sostenida o retrasada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

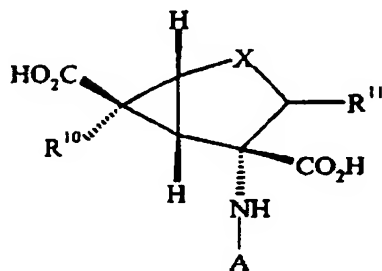
Las composiciones preferiblemente se formulan en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 300 mg de

ingrediente activo. Como se usa en este documento, la expresión "ingrediente activo" se refiere a un compuesto incluido dentro del alcance de Fórmula I.

5 El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosis unitaria para los seres humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación
10 con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico adecuado.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I



(I)

5 en la que

A es (Q)_p-;

Q es L-alanilo;

p es 1;

X es CR³R⁴;

10 R³ es fluoro y R⁴ es hidrógeno;

R¹⁰ es hidrógeno; y

R¹¹ es hidrógeno;

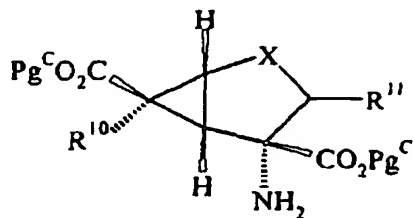
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 2. Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I que es una sal de adición de ácido obtenida con un ácido que proporciona un anión farmacéuticamente aceptable; una sal de adición de base obtenido con una base que proporciona un anión
20 farmacéuticamente aceptable para un compuesto que contiene un resto ácido; o un compuesto bipolar c que consta de grupos con cargas opuestas.

25 3. La sal farmacéuticamente aceptable de la Reivindicación 1, que se selecciona entre el grupo compuesto por:

- a) clorhidrato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- 5 b) mesilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- c) esilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- 10 d) besilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- e) tosilato del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- 15 f) ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico;
- y
- 20 g) sal monosódica del ácido 1*S*,2*R*,4*S*,5*S*,6*S*-(2'*S*-2'-aminopropionil)amino-2-fluorobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico.

4. Un procedimiento para preparar un compuesto de
- 25 Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprender acilar un compuesto de fórmula (ii)



(ii)

con un amino acilo correspondiente de Fórmula III



en la que p_g^N es un grupo protector de nitrógeno y A es como se ha definido anteriormente;

5 después de lo cual, para cualquiera de los procedimientos anteriores, cuando un grupo funcional está protegido usando un grupo protector, se elimina el grupo protector;

10 después de lo cual, para cualquiera de los procedimientos anteriores, cuando se requiere una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, se hace reaccionar la forma básica de tal compuesto de Fórmula I con un ácido que produzca un contraión farmacéuticamente aceptable; o, para un compuesto de
15 Fórmula I que lleva un resto ácido, se hace reaccionar la forma ácida de tal compuesto de Fórmula I con una base que produzca un catión farmacéuticamente aceptable; o, para un compuesto bipolar de Fórmula I, se neutraliza la forma de sal de adición de ácidos de
20 tal compuesto de Fórmula I; o por cualquier otro procedimiento convencional.

5. Un procedimiento para afectar a los receptores metabotrópicos de glutamato asociados a AMPc en un
25 paciente, que comprende administrar a un paciente que requiere la modulación de la neurotransmisión de aminoácidos excitadores una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

30 6. Un procedimiento de administración de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II, que comprende administrar a un paciente que requiere la modulación de la neurotransmisión de aminoácidos excitadores una
35 cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

7. Un procedimiento para el tratamiento de un trastorno neurológico en un paciente, que comprende administrar al paciente en necesidad de dicho
5 tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

8. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho trastorno neurológico es déficits cerebrales
10 que se producen después de un bypass cardíaco y de injertos; isquemia cerebral; traumatismo de la médula espinal; traumatismo craneal; enfermedad de Alzheimer; Corea de Huntington; esclerosis lateral amiotrófica; demencia inducida por el SIDA; hipoxia perinatal;
15 lesiones neuronales producidas por hipoglucemias; lesiones oculares y retinopatía; trastornos cognitivos; y Parkinson idiopático e inducido por fármacos; espasmos musculares; migrañas; incontinencia urinaria; tolerancia, adicción y síndrome de abstinencia de
20 drogas; síntomas que se producen cuando se deja de fumar; emesis; edema cerebral; dolor crónico; trastornos del sueño; convulsiones; síndrome de Tourette; trastorno de déficit de atención; y discinesia tardía.

25

9. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho trastorno neurológico es tolerancia, adicción y síndrome de abstinencia de drogas; o los síntomas que se producen cuando se deja de fumar.

30

10. Un procedimiento para tratar un trastorno psiquiátrico en un paciente, que comprende administrar al paciente en necesidad de tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la
35 reivindicación 1.

11. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicho trastorno psiquiátrico es esquizofrenia, ansiedad y trastornos relacionados, depresión,
5 trastorno bipolar, psicosis y trastornos obsesivo-compulsivos.

12. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho trastorno psiquiátrico es la ansiedad y
10 trastornos relacionados.

13. Una formulación farmacéutica que comprende, en asociación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de Fórmula I
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

RESUMEN

5 Esta invención se refiere a profármacos de aminoácidos excitadores sintéticos y a procedimientos para su preparación. La invención se refiere además a procedimientos de uso y a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos para el tratamiento de trastornos neurológicos y trastornos psiquiátricos.